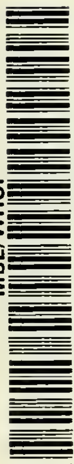
B. MENKES

CERCETĂRI DE EMBRIOLOGIE EXPERIMENTALĂ

VOL. I


MBL/WHOI
0 0301 0016991 6

CERCETĂRI
DE
EMBRIOLOGIE
EXPERIMENTALĂ

B. MENKES
MEMBRU CORESPONDENT AL ACADEMIEI R. P. R.



CERCETĂRI DE EMBRIOLOGIE EXPERIMENTALĂ

Vol. I

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII POPULARE ROMÎNE
1958

CUVÎNT ÎNAINTE

Orientarea miciurinistă a influențat puternic gîndirea și cercetările biologilor din țara noastră.

Ea a stîrnit un deosebit interes și pentru embriologia experimentală.

Într-adevăr, intervențiile asupra organismului în faza embrionară — de deosebită plasticitate — s-au arătat a fi un mijloc de studiu a însuși procesului de dezvoltare, deschizînd în același timp și perspectiva unei fecunde legături între teorie și practică în domeniul embriologiei.

Astfel, probleme ale biologiei omului, patologia sa pre- și postnatală, probleme zootehnice și veterinare, de agrobiologie etc., beneficiază direct sau indirect de pe urma aplicării metodelor experimentale în embriologie. Se conturează chiar posibilitățile dirijării ontogenezei.

La noi F. I. Rainer, în minunatele sale cursuri, a insistat asupra importanței studiului embriologiei.

Cercetările acad. C. I. Parhon și ale școlii sale pun în evidență rolul glandelor cu secreție internă în ontogeneza embrionară. Trebuie subliniat cu tărie că acad. C. I. Parhon — unul dintre fondatorii endocrinologiei moderne — a emis încă din 1909 ipoteza că secrețiile interne funcționează și în timpul vieții embrionare, avînd rolul lor în perioada principală a histogenezei și a formării organelor. Acad. C. I. Parhon a reluat în ultimii ani studiul rolului hormonilor în embriogeneză, problema stimulării creșterii și a patologiei fenomenelor de creștere.

Cercetările acad. V. D. Mîrza și ale prof. C. Szekely au contribuit — printre altele — la lărgirea cunoștințelor despre influența factorilor externi — ca lumina, oxigenul — asupra dezvoltării oului de pasăre.

Acad. Șt.-M. Milcu a studiat la galinacee efectul hrăniri cu iodoproteine asupra ouatului, năpîrlirii și comportării descendenței.

Prof. V. Preda studiază modificările morfologice indicatoare ale metabolismului tulburat în urma intervențiilor asupra sistemului nervos central al embrionului de găină, și influența temperaturii asupra dezvoltării oului.

Efectul injecțiilor de triturat heterorasial de embrion în albușul oului de găină constituie tema de care s-a ocupat prof. C. Crișan.

Volumul de față — primul dintr-o serie pe care sperăm s-o putem publica — prezintă, într-o formă sintetică, un grup de lucrări efectuate de autor — în cea mai mare parte împreună cu colectivul de embriologie experimentală al Bazei de cercetări științifice din Timișoara a Academiei Republicii Populare Romîne.

Volumul I conține cercetări asupra dezvoltării reactivității la embrion, un studiu asupra biologiei heterogrefelor embrionare, cercetări asupra funcțiilor unor organe embrionare și o analiză a interrelațiilor componenților complexului embrionar la embrionul de găină.

Inserarea unui capitol de introducere în tehnica observației vitale și a intervențiilor asupra embrionului de găină vrea să ajute mai cu seamă inițierea tinerilor cercetători în acest domeniu.

Prin folosirea datelor filogenetice, descriptiv comparative și ecologice, prin concepția experiențelor și interpretarea rezultatelor obținute ne-am străduit să aducem o modestă contribuție la precizarea și îmbogațirea unor elemente ale teoriei materialist-dialectice a dezvoltării.

Critica constructivă a cititorilor, pe care o așteptăm cu încredere, ne va arăta întrucît străduința noastră a reușit.

B. MENKES



CUPRINSUL

PARTEA A V-a

INTRODUCERE

DEZVOLTAREA ONTOGENETICĂ, PROPRIETATE GENERALĂ A FIINȚELOR VII

Dintre toate procesele de dezvoltare observabile în natură, ontogeneza ființelor vii este poate cel mai impresionant. Apariția într-un timp relativ scurt (uneori cîteva zile) a imensei complexități a organismului unui vertebrat, de pildă, găsește greu pereche în natură.

Fiecare ființă vie (inclusiv microorganismele) parcurge procesul ei de dezvoltare individuală. Se poate afirma că forma adultă nu se realizează niciodată de-a dreptul, ci numai după trecerea printr-un număr (ce-i drept, foarte variabil în seria animală și vegetală) de trepte și stadii de dezvoltare.

Dezvoltare individuală prezintă însă și constituenții intimi ai organismului, supuși unui proces de creștere și diviziune (celule, organite celulare, fibrile, macromolecule filamentoase etc.). Într-adevăr, concepția lui O. B. Lepeșinskaia despre inegalitatea produselor de diviziune celulară („celulă-mamă", „celulă-fiică"), deci despre o ontogeneză a însăși celulei, care începe cu fiecare diviziune celulară, s-a arătat a fi fecundă.

Din cercetările recente care confirmă această ipoteză putem cita lucrările acad. I. Malek, care a constatat la *Escherichia coli* diferențe între comportarea celor două bacterii rezultate din diviziunea uneia și aceleiași celule bacteriene, diferențe care dispar abia după un timp oarecare de existență a produsului diviziunii. Se cunosc de asemenea date corespunzătoare recente pentru ontogeneza virusurilor (pentru bacteriofag).

În majoritatea cazurilor, îndeosebi la metazoare și metafite, forma adultă se realizează numai pe căi foarte ocolite, după ce organismul a străbătut în dezvoltarea sa trepte ontogenetice uneori foarte diferite de stadiul pe deplin dezvoltat.

Etapa embrionară a ontogenezei ne impresionează și prin rapiditatea succesiunii acestor transformări, fără asemănare cu vreo perioadă de dezvoltare postembrionară.

Dezvoltarea embrionului este de fapt reluarea unui proces trecut, istoric acumulat și determinat.

Dar, strîns împletit cu aceasta, embrionul își are actualitatea sa morfo-funcțională. El trăiește și posedă țesuturi și organe care îi asigură, prin funcțiile lor, viața și continuarea procesului de dezvoltare.

O dată cu perioada ontogenetică embrionară începe însă și adaptarea la noi condiții, sub acțiunea cărora dezvoltarea individuală, și prin aceasta dezvoltarea generațiilor viitoare, poate fi modificată. În acest sens s-ar putea spune că fiecare ontogeneză reunește într-o anumită privință trecutul, prezentul și viitorul.

Întemeietorii embriologiei, F. W o l f f și K. E. B a e r, au scos la iveală aspectul în trepte succesive al procesului de dezvoltare a embrionului, W o l f f demonstrînd natura epigenetică a procesului, iar B a e r pregătind, prin cunoscutele sale legi (cu toate că nu era de loc transformist), înțelegerea perspectivelor istorice, semnificația filogenetică a treptelor intermediare, postulate mai tîrziu de legea biogenetică a lui M ü l l e r - H a e c k e l.

Dar epigeneza lui W o l f f nu ajunge pînă la sezisarea forțelor motrice materiale ale procesului de dezvoltare individuală, la căutarea condițiilor necesare în care o formă precedentă poate deveni punctul de plecare al celei următoare în procesul epigenetic.

Pe de altă parte, regula așa-ziselor recapitulări filogenetice a lui M ü l l e r - H a e c k e l nu ne spune nimic despre mecanismul, despre explicația reală a reapariției formelor vechi în decursul unei ontogeneze actuale, despre factorii și forțele actuale, prezente în formațiunile embrionare și mediul lor propriu, care determină apariția acestor trepte intermediare și în absența condițiilor primare sub a căror influență au apărut, cîndva, ca procese adaptive.

Interesanta concepție a stadiilor de dezvoltare și a condițiilor stadiale, elaborată de acad. T. D. L î s e n k o, constituie, după părerea noastră, o dezvoltare firească a concepției epigenezei a lui W o l f f, în care se coordonează cu fiecare pas epigenetic nou în procesul de dezvoltare, condițiile sale necesare.

Este o greșeală răspîndită de a crede că genetica formală ar oferi elemente explicative suficiente pentru procesul ontogenetic. Prezența unor purtători corpusculari de ereditate într-un genom nu poate explica — în nici un caz ea singură — desfășurarea ordonată, în timp și spațiu, a proceselor care duc la formarea unui organism, indiferent în care stadiu l-am considera.

Însă, nici concepția istorică nu ne poate dispensa să cercetăm condițiile, factorii, forțele motrice concrete, actuale, prezente, ale acestui proces.

POZIȚIA FENOMENULUI DEZVOLTĂRII ONTOGENETICE A ORGANISMELOR ÎN PROCESUL GENERAL DE MIȘCARE, TRANSFORMARE ȘI DEZVOLTARE A MATERIEI

De ce natură sînt și de unde izvorăsc forțele motrice ale procesului ontogenetic? Cum se realizează și ce semnificație au treptele intermediare ale proceselor de dezvoltare ale embrionului?

Rezolvarea acestor probleme cade în sarcina concepției materialist-dialectice a dezvoltării.

Filogeneza, susținută de șirul necontenitelor ontogeneze succesive și, în mod deosebit, de procesul individual de dezvoltare, oglindește, poate mai intens decît orice alt fenomen din natură, legile cele mai generale ale mișcării și dezvoltării materiei. Astfel,

trecerile modificărilor cantitative în calitative (salturi calitative), reapariția într-un tip de organizare superior a trăsăturilor formelor de dezvoltare anterioare (vechi), întrepătrunderea, — lupta —, contrariilor sau deosebirilor coexistente, apariția acestora, se impun oricărui observator al acestui proces extraordinar.

Înăuntrul procesului general de mișcare și transformare a materiei (nu orice transformare este o dezvoltare !), dezvoltarea ființelor vii apare ca un caz special, avînd calitatea sa nouă. Înăuntrul continuității materiei, ontogenezele apar ca puncte nodale ale dezvoltării.

Orice obiect, orice fenomen conține contradicțiile sale interne, izvorul dezvoltării și automișcării (V. I. Lenin).

Cauza dezvoltării stă deci înăuntrul lucrurilor, în însăși esența lor. Materia este ea însăși cauza dezvoltării sale (Fr. Engels).

Mișcarea rezultă din influența reciprocă a corpurilor : fără interacțiunea lor, [lupta contrariilor], cauza dezvoltării, mișcarea n-are loc. Dialecticaeste știința conexiunilor, a interacțiunilor. Interacțiunea este primul lucru care ne izbește cînd examinăm mișcarea materiei (Fr. Engels).

Procesele de dezvoltare ale ființelor vii sînt deci totdeauna complexe de interacțiuni. Ele nu pot fi cercetate și explicate decît prin descoperirea și analiza urmate de sinteza tuturor elementelor, condițiilor, factorilor în continuă transformare, participanți la constituirea acestui complex interacțional care stă la baza dezvoltării și merită denumirea de *complex ontogenetic*. Noi analizăm aici faza embrionară a acestui complex ontogenetic : ,,*Complex ontogenetic embrionar*''. Această interacțiune nu trebuie însă privită ca un *desmos hapanton* (legătura tuturor lucrurilor, Heraclit) de intensitate uniformă, între toți componenții, de orice grad. Aceasta ne-ar duce la o simplificare grosolană, mecanicistă, a concepției interacțiunii.

Este sarcina concretă a embriologiei experimentale de a descoperi întinderea, gradul, perioada ,,maximă și minimă" a raporturilor interacționale, etajele structurale cărora le aparțin componenții interacțiunii hotărîtoare pentru fiecare proces al dezvoltării, constituind ,,centrul de greutate interacțional'' al procesului respectiv.

Aceste elemente cuprind uneori întreaga sferă a complexului ontogenetic, alteori însă ele se restrîng — ca zone de importanță maximă — la raporturi între anumiți constituenți ai unor părți ai acestui complex, fără ca restul să-și piardă însă importanța în sistemul interacțional.

Materialismul dialectic ne dă legile generale ale proceselor de mișcare și dezvoltare. Cînd se trece însă la studiul cazului concret, în cazul nostru la studiul ontogenezei embrionare, trebuie delimitată sfera de acțiune a tuturor elementelor constitutive, în prealabil identificate, care acționează și interacționează în procesul ontogenetic.

Orientarea miciurinistă și pavlovistă în biologie constituie o aplicare a principiilor materialismului dialectic în studiul și concepția dezvoltării organismului, iar conceptul complexului ontogenetic derivă direct din această orientare.

Metodele de dirijare a ontogenezei, aplicate de Miciurin și școala sa, au deschis embriologiei experimentale și aplicate un larg domeniu de dezvoltare, cu perspectiva unei fecunde legături între teorie și practică.

Considerînd faza embrionară a ontogenezei ca cea mai plastică, atenția biologilor experimentatori a fost din nou îndreptată asupra intervențiilor în sistemul de interrelații al complexului ontogenetic embrionar. Sub influența școlii miciuriniste au apărut interesante metode de recombinare experimentală a complexului embrionar, din constituenți

aparținînd unor parteneri de rase sau specii diferite, cum sînt, de pildă: introducerea gălbenușului într-un oviduct străin, unde capătă un strat de albuș heterorasial sau heterospecific, așezarea embrionului vegetal (cereale), pe un heteroendosperm, înlocuiri de albuș la oul de pasăre, introducerea ovulelor fecundate în oviducte străine la mamifere, transplantări de ovare întregi în mame adoptive de altă rasă sau specie etc.

Cu toate că rezultatele obținute prin aplicarea acestor metode nu ne permit încă aprecierea definitivă a lor, se poate afirma de pe acum că ele deschid un vast domeniu de lucru, extrem de atrăgător și bogat în perspective.

Rolul sistemului nervos, de mijlocitor între mediu și organism, subordonarea treptată a metabolismului general și local acțiunii sistemului nervos în timpul ontogenezei, elemente

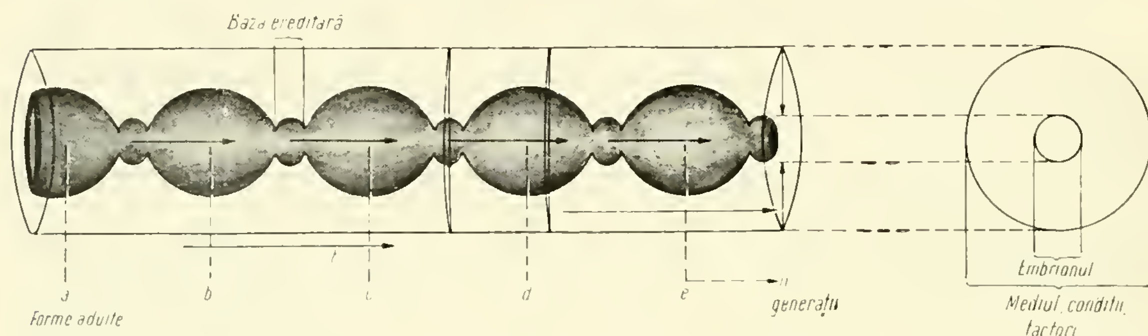


Fig. 1. — Bazele conceptului general al complexului ontogenetic.

a, b, c, d, e ... — generații succesive, în continuitatea lor materială „Învelișul" exterior = continuitatea condițiilor și factorilor de mediu, necesari vieții și dezvoltării. Săgețile verticale = factorii „actuali" care intervin în ontogeneză. Săgețile orizontale — succesiunea filogenetică (istorică) a factorilor.

esențiale ale învățăturii lui I. P. Pavlov, au devenit și ele — împreună cu concepția sa a transformării filogenetice a reflexelor condiționate în reflexe necondiționate — indispensabile concepției sintetice materialist-dialectice a procesului de dezvoltare.

Apare astfel firesc faptul că majoritatea covîrșitoare a embriologilor și biologilor contemporani, care stau pe pozițiile materialismului dialectic, exprimă și susțin — sub diferite forme — concepția complexului ontogenetic.

În țara noastră, acad. C. I. Parhon, pe care-l putem considera întemeietorul orientării experimentale în embriologie la noi, susține în cartea sa, „Biologia vîrstelor" ideea complexului interacțional ontogenetic, ca și acad. V. D. Mîrza în lucrarea sa „Embriotrofia".

Schema alăturată (fig. 1) este menită să ușureze înțelegerea conceptului general al complexului ontogenetic. Sînt prezentate aci, simplificat, generații succesive *a*, *b*, *c*, *d*, *e*,....*n*, în continuitatea lor materială și este înfățișată în același timp — formîndu-le un înveliș exterior — continuitatea condițiilor și factorilor de mediu indispensabili vieții și dezvoltării sau intervenind în procesele de dezvoltare. Săgețile orizontale reprezintă dezvoltarea organismelor și a elementelor mediului, succesiunea în timp a condițiilor și factorilor de mediu, *aspectul istoric*. Săgețile verticale care se văd pe secțiunile transversale, făcute prin schema complexului ontogenetic, reprezintă totalitatea elementelor, condițiilor, factorilor care intervin în procesul de dezvoltare sau fac parte din acest proces, deci, conținutul complexului ontogenetic într-un moment dat, totalitatea elementelor concrete,

actuale, prezente și active care interacționează în momentul realizării unei anumite trepte ontogenetice : *aspectul actual.*

Oricît de vechi ar fi, filogenetic, formațiunile sau funcțiile „reproduse" de procesul de ereditate, ele se realizează în decursul unei dezvoltări individuale numai datorită înlănțuirii unor procese actuale, prezente în complexul embrionar.

Ereditatea nu există în afara acestor procese.

Dar fiecare element constitutiv al acestui complex este — în momentul în care îl examinăm — numai termenul cel mai recent al unei lungi serii evolutive, istorice.

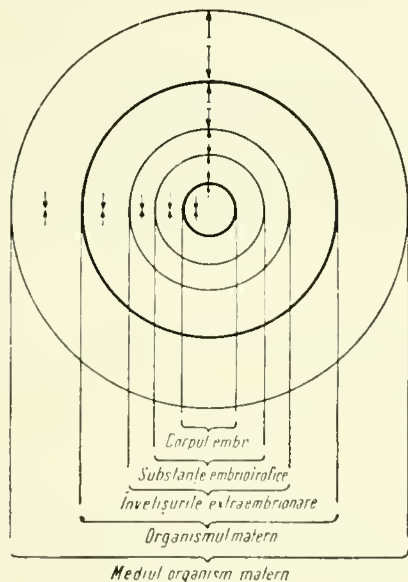


Fig. 2. — Schema topografică a elementelor constitutive ale complexului embrionar.

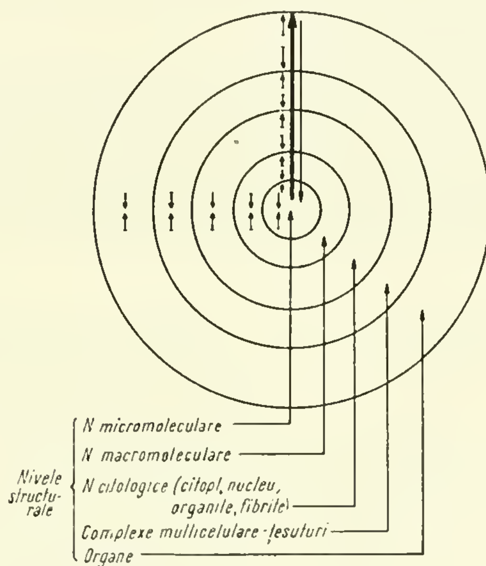


Fig. 3. — Schema reprezentînd principiul de sistematizare pe baza existenței etajelor sau nivelurilor structurale.

A analiza elementele constitutive ale acestui complex înseamnă a dezvălui contradicțiile interne ale unui sistem de interacțiuni, a scoate la iveală forțele automișcării și dezvoltării lui, a căuta conținutul intern al procesului de dezvoltare în cazul concret.

Convingerea că totalitatea forțelor motrice ale procesului ontogenetic își au sursa și pot fi exprimate prin acest complex ontogenetic embrionar, istoric determinat, izvorînd din interacțiunile care au loc în sînul acestuia, constituie însăși una din bazele concepției materialist-dialectice ale ontogenezei.

Ne servim de două principii de sistematizare a complexului ontogenetic, înfățișate în fig. 2 și 3, care reprezintă proiecțiile secțiunilor transversale din fig. 1 :

O primă *schemă „topografică"*, care înfățișează elementele constitutive ale complexului embrionar pe orbite concentrice, orînduite după criterii topografico-spațiale. De exemplu : corpul embrionului, cu părțile sale constitutive, organele sale anexe, substanțele embriotrofice — dacă este cazul — învelișurile, oviductul, organismul matern, ambianța acestuia.

O a doua schemă — completînd pe prima — *reprezintă principiul de sistematizare pe baza existenței etajelor sau nivelurilor structurale*, care se găsesc de-a lungul unei „dimen-

siuni morfologice", în adîncimea morfologică a părților vii ale complexului. De exemplu : etajul sau nivelul ultrastructural, cuprinzînd structuri micromoleculare sau macromoleculare, nivelul structurilor microscopice — celula cu citoplasma și organite citoplasmatice, nucleul, cromozomii, apoi fibrile, fibre etc. ; nivelul structurilor multicelulare, nivelul micro-macroscopic. O serie de autori au subîmpărțit morfologia în domenii ale căror elemente structurale aparțin diferitelor ordini de mărimi (Frey-Wyssling, Davîdovski, Menkes). Această idee este conformă concepției materialist-dialectice a morfologiei și ontogenezei.

Trebuie ținut seama de interrelațiile și interacțiunile care se stabilesc între elementele uneia și aceleiași orbite sau unuia și aceluiași nivel și între elementele orbitelor sau nivelurilor deosebite.

Fiind vorba de un sistem interacțional, procesele normale sau patologice, intervențiile experimentale în oricare dintre orbite, trebuie să influențeze, principial, și elementele celorlalte orbite. Sistemul se arată deci influențabil din orice orbită. Totuși, importanța orbitelor și elementelor lor constitutive, valoarea „granițelor" dintre ele, diferă și se schimbă în cursul procesului de dezvoltare, apărînd „laturi principale" și „laturi secundare" printre elementele în raport interacțional.

DESPRE NATURA ȘI MODUL DE DECLANȘARE A INTERACȚIUNILOR DIN COMPLEXUL EMBRIONAR

Putem distinge mai multe moduri elementare de interacțiuni, care variază și se combină diferit de-a lungul ontogenezei.

a) Difuziunea sau transportul de substanțe între diverși componenți ai complexului (substanțe energetice, fermenți, hormoni, ergoni, auxine, trefone etc.). Acest tip de interacțiune — care stă la baza chemomorfozelor — constituie obiectul unor cercetări recente cu ajutorul implantelor conținînd izotopi radioactivi. S-a putut urmări astfel și prin autoradiografie difuziunea unor substanțe conținînd acești izotopi în complexul embrionar.

Conform unei ipoteze de lucru relativ recente (P. Weiss), o formă importantă de interacțiune legată de această modalitate ar fi reacțiile de tip antigen-anticorp. Pare să fie vorba de sinteza proteinelor „complementare", față de proteine preexistente, „antigene", care ar provoca apariția primelor. O deosebită dezvoltare a luat în ultimul timp cercetarea prin folosirea antiserurilor a momentului apariției (prin chemosinteză) a antigenelor organospecifice.

B. P. Tokin face în excelenta sa lucrare, „Imunitatea embrionului" (1956), o trecere în revistă a principiilor embriologiei imunologice. Putem cita aici și lucrările lui N. I. Jukov-Verejnikov, O. E. Viazov, G. V. Lopașov și O. V. Stroeva, P. Weiss, Taylor etc.

b) Migrări și deplasări de celule sau structuri necelulare. Pătrunderea în teritorii învecinate și îndepărtate (de ex. fascicule nervoase). Interrelații „de contiguitate".

c) Activitatea sistemului nervos și neuro-umoral acolo unde acest sistem apare : influențarea metabolismului prin mediatori (aparține de fapt modalității din punctul *a*).

d) Influențări mecanice (mecanomorfoze). Creșterea volumului organelor, acumularea de lichide în cantități mai mari, stîrnesc tracțiuni, tensiuni, presiuni etc. Pulsațiile inimii sînt, de exemplu, izvorul unor asemenea forțe mecanice importante în procesul ontogenetic. Diferențierea somitelor produce o tracțiune longitudinală în corpul embrio-

nului, căreia îi urmează instalarea unei tracțiuni transversale, produsă de diferențierea membrelor și de migrarea primordiilor musculare în direcția antero-laterală a trunchiului. Deschiderea experimentală a tubului neural, de pildă, are drept consecință modificări în topografia organelor învecinate. Distrugerea unui glob ocular modifică structura scheletului facial, pulsațiile inimii determină apariția țesutului elastic mediastino-vascular etc.

e) Influențări prin alți factori fizici și fizico-chimici (radiații, electricitate etc.).

O trăsătură esențială a proceselor care au loc în sînul complexului embrionar este schimbarea raporturilor interacționale. Fiecare treaptă de dezvoltare se caracterizează de fapt, calitativ și cantitativ, prin anumite raporturi între componenți. Interacțiunile nu urmează schema acțiunii și contraacțiunii de aceeași intensitate dar de sens opus, ceea ce ar condiționa o stare de echilibru.

Între două elemente, *a* și *b*, în perioada *t'*, influența în direcția de la *a* spre *b* poate să fie mai mare decît de la *b* spre *a*. Dacă mai adăugăm un al treilea component, *c*, ne putem închipui un sistem de influențări intense în sensul *a* spre *b*, *b* spre *c*, *c* spre *a*, coexistînd cu altul mai slab în sensul *c* spre *b*, *b* spre *a*, *a* spre *c*.

Citām, spre exemplu, raporturile care se stabilesc între albuș, gălbenuș și embrion la păsări, sau apariția unor zone cu intensitate metabolică deosebită în sînul corpului embrionar, cu efecte de organizator.

În perioada următoare, *t''*, a dezvoltării, raporturile pot fi răsturnate sau schimbate.

În sînul acestei concepții a interacțiunilor, cauzalitatea căpătă o formă nouă.

„Interacțiunea exclude orice caracter absolut primar sau absolut secundar, dar în același timp ea este un proces bilateral... pentru a-l înțelege în ansamblul lui, el trebuie cercetat separat, mai întîi dintr-un punct de vedere și apoi din celălalt, înainte de a putea sintetiza rezultatul total" (Fr. Engels)[1]).

Declanșarea proceselor de interacțiune necesită de multe ori schimbări în structura orbitelor externe ale complexului (introducerea de energie din afară) de exemplu, încălzirea oului, care permite elementelor constitutive ale embrionului să reacționeze cu substanțele embriotrofice îngrămădite în imediata lor apropiere. (Nu abordăm aici, vastul material faptic adunat).

Printre procesele care au loc în sînul complexului ontogenetic embrionar, un loc de frunte îl ocupă *fenomenul de interiorizare*. Conceptul complexului ontogenetic facilitează îndeosebi înțelegerea procesului de interiorizare, a transformării externului în intern, proces care a stat la baza orientării ecologice în embriologie. Embriologia ecologică își propune, după G. A. Șmidt, să stabilească dependența procesului de morfogeneză embrionară de condițiile de existență ale organismului în diversele stadii ale dezvoltării sale.

Majoritatea proceselor ontogenetice sînt „interiorizate" în urma unui proces de trecere de la extern spre intern a condițiilor și factorilor de dezvoltare.

Vechile condiții de existență, care, cîndva, au dat naștere proceselor ontogenetice în decursul filogenezei, pot fi dispărute complet, sau să-și fi pierdut caracterul de actualitate (sau de latură principală), fiind cu totul înlocuite — în condițiile ontogenetice actuale — de procese corespunzătoare, însă situate în orbite interne ale complexului, de exemplu, apariția despicăturilor branhiale la vertebratele terestre.

[1]) Fr. Engels, Dialectica naturii, Ed. de stat pentru literatură politică, 1954, p. 164—165.

Unele procese ontogenetice embrionare și-au păstrat încă legături nemijlocite cu condiții actuale din mediul extern. Astfel, cercetările lui A. Mașkovțev au demonstrat că dezvoltarea plămînilor la *Axolotl* este împiedicată sau încetinită dacă oprim accesul animalului spre suprafața apei; la *Bufo*, însă, plămînul se dezvoltă normal și în aceste condiții experimentale. Aci procesul este deci „mai interiorizat”.

Putem vorbi astfel despre:

— interiorizări totale sau parțiale în timpul ontogenezei, și despre

— interiorizări filogenetice.

Schema din fig. 4 înfățișează diverse etape de interiorizare, adică, de fapt, relațiile dintre sferele complexului ontogenetic.

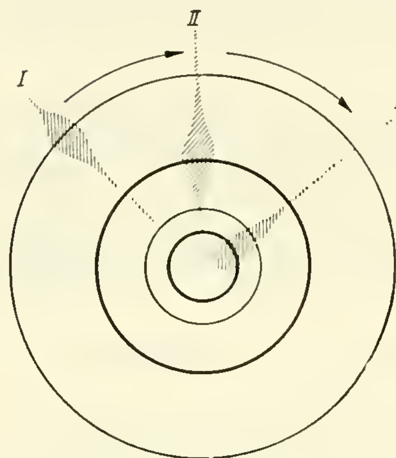


Fig. 4. — Diversele etape de interiorizare: relațiile dintre sferele complexului ontogenetic.

O ipoteză de lucru interesantă asupra modului interacțiunilor dintre diferitele orbite ale complexului ontogenetic se bazează pe o comparație cu fenomenul stereotipului dinamic. Acesta se formează — după cum se știe — în urma activității de sistematizare (I. P. Pavlov) a emisferelor cerebrale, printr-o legătură a efectelor produse de una și aceeași succesiune, de multe ori repetată, de excitanți diferiți. Cum se știe, în asemenea condiții, aplicarea numai a primului excitant din serie poate declanșa, uneori, întreaga succesiune a efectelor întregii serii.

Într-adevăr, multe procese ontogenetice prezintă în desfășurarea lor o oarecare asemănare cu acest fenomen al stereotipului dinamic, devenit cunoscut prin cercetarea activității nervoase superioare. Concepția existenței unor stereotipuri dinamice și în procesul ontogenetic reprezintă însă, de fapt, o comparație între însușirile substanței vii ajunse la stadii extrem de evoluate, cum este scoarța cerebrală a vertebratelor superioare adulte, cu substanța vie de la începutul procesului ontogenetic.

Interiorizarea și legătura filogenetic dobîndită a unui număr foarte mare de factori („excitanți”) ar crea în embrion — conform ipotezei de lucru enunțate — un „mozaic dinamic” capabil să reproducă, după acțiunea unui singur excitant sau a unui grup redus de excitanți într-o anumită succesiune și ordine, „ritmul” fenomenelor care constituie, în ansamblul lor, însuși procesul de dezvoltare.

Rolul pe care diferiții componenți ai organismului embrionului îl joacă în sistemul interacțional se schimbă de la o treaptă de dezvoltare la alta. Pe măsură ce se diferențiază țesuturile și organele se diferențiază, mergînd de la simplu la complicat, și interrelațiile lor.

Organul embrionar este rezultatul necesar al interacțiunilor din complexul embrionar, devenind — pe măsură ce se dezvoltă —, la rîndul său, un factor în acest complex, manifestîndu-și astfel funcția lui.

Așa-zisa dezvoltare independentă (prin autodeterminare) a fragmentelor izolate sau transplantate se explică prin persistența unui număr suficient de sisteme de interrelații rămase intacte în transplant, respectiv în explant, printr-o „rezervă metabolică” acumulată de acesta încă din timpul existenței sale înăuntrul vechiului complex ontogenetic (fig. 5).

Realizarea procesului ontogenetic, parcurgerea fiecărui stadiu, necesită pentru fiecare parte a corpului embrionar prezența unui anumit complex de condiții care trebuie

să apară înăuntrul sistemului interacțional, statornicit în decursul filogenezei. Este clar că pe baza acestei concepții nu se pot admite așa-zisele „perioade prefuncționale", așa cum au fost imaginate de W i l h e l m R o u x, ci trebuie admise „funcții preadulte", deci funcții diferite de cele ale organismului pe deplin diferențiat.

Concepția lui W. R o u x asupra perioadei prefuncționale rupe de fapt forma de funcție, permițînd organului să treacă printr-o perioadă de intensă morfogeneză, considerată însă afuncțională.

Există însă, în realitate, o continuă evoluție a interrelațiilor dintre elementele constitutive ale embrionului, deci și a funcțiilor lor, pînă la atingerea pragului funcțional

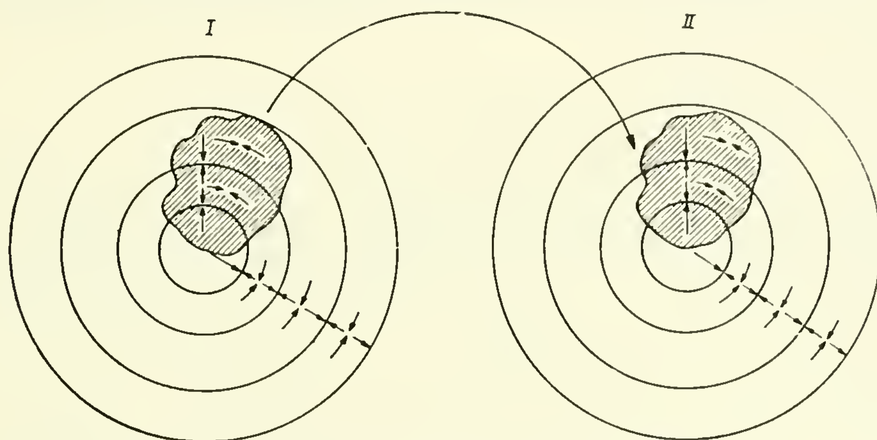


Fig. 5. — Sistemele de interrelații în cazul transplantărilor.

adult. Astfel, distrugerea măduvei la embrionul de găină nu împiedică diferențierea membrelor din teritoriul distrus pînă în a 12-a zi de incubație. Tulburările în diferențierea membrelor se instalează abia după atingerea acestei vîrste, cînd integritatea sistemului nervos devine necesară progresului ontogenetic normal. Integritatea tubului neural este însă necesară diferențierii vertebrelor (îndeosebi a arcurilor vertebrale), a musculaturii dorsale etc.

Pînă la atingerea asemănării funcționale și morfologice cu organismul pe deplin dezvoltat, organele embrionare pot avea deci funcții care diferă cantitativ sau calitativ de cele definitive („funcții preadulte"). W i e n t r e b e r t și N e e d h a m vorbesc despre funcții „tranzitorii".

Menținerea treptelor intermediare în decursul procesului ontogenetic trebuie privită și cercetată prin prisma funcțiilor preadulte îndeplinite de aceste forme intermediare în complexul embrional, funcții ce determină menținerea lor în anumite perioade.

Putem cita ca exemple — lăsînd la o parte cunoscutele efecte de inducție și organizare —, rolul globului ocular în dezvoltarea masivului facial, activitatea secretoare a epiteliului bronșic în primele faze ale dezvoltării plămînului, fenomenele de secreție merocrină observate la nivelul mucoasei gastrice în jurul celei de-a 12-a zile de incubație la embrionul de găină, rolul contracțiilor inimii pentru diferențierea țesutului elastic (formîndu-se un organ elastic trecător).

Cunoașterea tuturor interacțiunilor caracteristice fiecărei faze de dezvoltare ar fi echivalentă cu înțelegerea întregului proces de dezvoltare, dar de acest obiectiv sîntem încă foarte departați.

Sarcina importantă a embriologiei experimentale este de a umple acest gol în cunoștințele noastre, de a delimita sfera complexului embrionar ontogenetic, de a-i identifica elementele constitutive, de a le sistematiza ca natură, situație topografică, repartiție, mod și grad de influență reciprocă, și variația acestora de-a lungul întregii perioade de dezvoltare.

Ontogeneza embrionară nu poate fi cercetată cu succes considerînd părțile embrionului izolate unele de altele. Diferitele regiuni și părți constitutive ale complexului embrionar, substanțele sale nutritive și plastice, anexele embrionului, organismul parental și mediul acestuia, toți acești componenți de bază în procesul dezvoltării embrionare — constituind complexul ontogenetic embrionar — trebuie priviți, în sensul expus mai sus, în legătură și interacțiune de-a lungul diferitelor etape ale procesului de dezvoltare.

Neglijarea studiului acestui complex constituie una din neajunsurile orientării numite „mecanica dezvoltării".

Rezultatul complicatelor interacțiuni din complexul embrionar poate fi considerat și ca un efect al reactivității componenților vii ai acestui complex.

Formele și modalitățile acestei reactivități „de interacțiune" se schimbă pentru fiecare parte a organismului embrionar în timpul parcurgerii treptelor de dezvoltare (evoluția reactivității)). Sîntem îndreptățiți să căutăm în ontogeneza embrionară succesiunea și perfecționarea modurilor de reactivitate, începînd cu forme elementare, asemănătoare celor prezente la protozoare, ca mișcări celulare, fagocitoză, digestie intracelulară etc., mergînd pînă la formele cele mai dezvoltate.

Din cele spuse reiese strînsa legătură dintre interacțiunea constituenților în complexul embrionar, reactivitatea lor și însuși procesul ontogenetic.

Din acest punct de vedere putem considera întregul proces ontogenetic embrionar, sub aspectul său funcțional și morfologic, ca expresia reactivității constituenților vii ai embrionului și anexelor sale, care se dezvoltă în condițiile unui sistem complex de interrelații în continuă transformare.

Pe baza concepției lui I. I. M e c i n i k o v, care a pus reactivitatea la baza înțelegerii filogenezei, cercetarea reactivității componenților complexului embrionar actual devine un mijloc important de analiză a procesului ontogenetic. Astfel, compararea reactivității corpului embrionar cu cea a organelor sale anexe, îndeosebi cu corion-alantoida, ne-a permis să constatăm, la embrionul de găină, existența unor importante diferențe a reactivității în aceste două regiuni deosebite ale complexului embrionar, și anume o reactivitate mult mai puternică la nivelul membranelor extraembrionare decît în însuși corpul embrionului.

În cazul oului de pasăre explicăm această diferență de reactivitate printr-o adaptare a straturilor vii superficiale, care vin primele în contact cu agenții exogeni, microorganisme etc., pătrunși prin porii cojii în ou, adaptare care lipsește deocamdată corpului propriu-zis al embrionului, situat în adîncime, protejat de organele sale extraembrionare.

Am schițat contururile conceptului complexului embrionar. Ne dăm seama că schemelor noastre le lipsește încă mlădierea necesară înfățișării dialecticii conexiunilor. Noi am urmărit însă aci, în primul rînd, delimitarea generală a problemei și crearea unei baze de discuții.

Conceptul complexului embrionar s-a arătat a fi util și la sistematizarea lucrărilor experimentale de analiză a procesului ontogenetic și pentru cercetări în domeniul dirijării ontogenezei.

Din sistematizarea factorilor și a condițiilor proceselor de dezvoltare în schema complexului embrionar reiese importanța covîrșitoare a analizei factorilor actuali, garantînd

ordinea desfășurării proceselor ontogenetice, pe care realitatea observabilă ni le înfățișează cu atîta putere și despre care sîntem pînă acum atît de puțin informați.

Embriologia experimentală și cauzală se află, de fapt, abia la începutul erei sale cu adevărat științifice.

Nu cunoaștem decît în foarte mică măsură legătura dintre structura biochimică și structurile micro- și macroscopice. Cunoaștem de asemenea prea puțin mecanismele și modalitățile de interiorizare a factorilor și condițiilor de mediu în orbitele interioare ale complexului embrionar, de-a lungul filo- și ontogenezei.

Concepția materialist-dialectică a dezvoltării pregătește și precizează însă cîmpul și direcțiile de cercetare, asigurînd progresul spre adevărul obiectiv pe calea cea mai scurtă.

BIBLIOGRAFIE

1. Bliaker L. A., *Istoria embriologhii v Rossii*, Izd. Akad. Nauk SSSR, 1955, p. 159.
2. Engels Fr., *Dialectica naturii*, București, E.P.L.P., 1954.
3. Ficq A., *Analyse de l'induction neurale par autoradiographie*, Experientia, vol. X, nr. 1, 1954, p. 20.
4. Frey-Wyssling A., *Submikroskopische Morphologie des Protoplasmas und seiner Derivate*, Protoplasma Monographien, t. XV, Berlin, Bornträger, 1938.
5. Jukov-Verejnikov N. I., *Ilia Ilici Mecinikov i biologhiceskie osnov immunologhii*, Uspehi sovrem. biol., vol. 18, nr. 1, p. 93–104.
6. Lenin V. I., *Caiete filozofice*, București, E.S.P.L.P., 1956, p. 322.
7. Lepeșinskaia O. B., *Geneza celulelor din substanța vie și rolul substanței vii în organism*, Ed. Acad. R.P.R., 1952.
8. Lopașov G. V. i Stroeva O. V., *Rezvitie immunologhiceskih reakții i problema nesovmesti mesti tkani pri peresadkah.* Usp. sovrem. biol. 1950, t. 30, p. 234.
9. Malek I., *O delenii bakterii cehoslovațkoi Biologhii*, 1953, t. 2, nr. 1, p. 12.
10. Menkes B., *Conceptul lărgit al morfologiei și dialectica formei*, Studii, 1948, nr. 2, p. 50.
11. — *Contribuții la orientarea anatomiei patologice*, Bul. anat. patol. 1955, nr. 1, p. 6.
12. Miciurin I. V., *Opere alese*, Ed. Acad. R.P.R., 1954.
13. Mîrza V. D., *Embriotrofia*, partea I, Ed. Acad. R.P.R., 1954.
14. Needham I., *Chemical Embryology*, Cambridge Univ. Press, 1931, vol. III, p. 1627.
15. Parhon C. I., *Biologia vîrstelor. Cercetări clinice*, Ed. Acad. R.P.R., 1955.
16. Pavlov I. P., *Opere alese*, ed. a 2-a, Ed. Acad. R.P.R., 1952.
17. Șmidt G. A., *Embriologie animală*, vol. 1, București, Ed. agro-silvică de stat, 1955.
18. Tokin B. P., *Immunitet zarodișei*, Izd. Leningr. Univ., 1955.
19. Taylor A., *An Auto Antibody Concept of Cell Structure, Growth and Differentiation*, Sixth Growth Symposion, 7–19, 1947.
20. Viazov O. E., *Nekotorie dannie po izuceniu antighennîh svoistv embrionalnîh tkanei*, Biull. eksp. biol. i med., 1953, nr. 8, p. 55–59.
21. Weiss P., *Principles of Development*, New York, H. Holt et Comp., 1939.
22. — *The Problem of Specificity in Growth and Development*, Yale I. Biol. Acad. Med., vol. 19, nr. 3, 1941, p. 235.

PARTEA I

INTRODUCERE ÎN TEHNICA OBSERVAȚIEI VITALE ȘI A INTERVENȚIILOR DIRECTE ASUPRA EMBRIONULUI DE PASĂRE

CONȚINUTUL

1. Principii generale ale tehnicii observației vitale.

2. Metode de observație vitală a embrionului și anexelor sale *in situ*: ovoscopia, observația prin membrana papiracee; ferestruirea oului; dispozitive de observație micro-macroscopice și microscopice; microtermostatul de ou; microscopul ultropac; examenul în lumina ultravioletă filtrată (Wood); colorația vitală. Tehnici de incubație și observație a embrionului de pasăre scos din coajă. Transvazarea gălbenușului și albușului în recipiente artificiale. Observația vitală a embrionului împreună cu aria sa vasculară (avînd circulația intactă) după îndepărtarea gălbenușului.

3. Despre intervențiile directe și indirecte asupra embrionului de găină și a anexelor sale. Generalități; metode directe mecanice; fabricarea microinstrumentelor; micrometode termice; electrocoagularea (electroliza); distrugeri localizate prin iradieri cu raze ultraviolete; mînuirea microinstrumentelor; tehnica diferitelor injecții: în corpul embrionului, în anexele sale și în aparatul circulator (injecții intravenoase, intraaortice, interstițiale, intracardiace, injecția venelor alantoidiene). Dezamniotizarea. Dezalantoidizarea (extirparea veziculei alantoidiene).

4. Transplantări embrionare.

a. Transplantare pe corpul embrionului: a) în celom. b) prin metoda mieloschizisului.

b. Transplantarea pe membrana corion-alantoidă.

c. Transplantarea pe aria vasculară a sacului vitelin.

d. Despre explantare (cultură de țesut); cultura în picătura suspendată; cultura în lichidul amniotic; în cavitatea amniotică a embrionului viu; cultura „în ou".

5. Despre micromanipulare.

6. Despre fotografie și microfotografie, ajutor indispensabil în embriologia experimentală.

7. Despre unele metode biochimice, biofizice și imunologice în biologia experimentală.

Anexa I. Sistematizarea metodelor și tehnicilor în embriologia experimentală pe baza principiului „etajelor structurale".

Anexa II. Metode histochimice aplicate în cercetări asupra embrionului de găină, de C. Rîmniceanu.

Anexa III. Elemente de anatomie normală a embrionului de găină. Anatomia topografică a regiunilor operatoare.

Acest capitol se adresează, în primul rînd, celor care doresc să se inițieze în embriologia experimentală sau care trebuie să mînuiască embrionul de găină în alte scopuri.

Se știe cît de mult apreciază nu numai începătorii indicațiile tehnice verificate și probate, cît de binevenite sînt asemenea indicații, nu numai la primii pași, ci și mai tîrziu, cercetătorilor mai înaintați. Descrierea noastră nu va ocoli deci amănuntele, micile ,,tururi de mînă'', prețuite cît trebuie numai de acela care lucrează efectiv, mînuind singur materialul experimental.

Interesul crescînd pe care îl manifestă astăzi îndeosebi tinerii cercetători pentru embriologia experimentală și mai cu seamă faptul că am putut fi de folos unui număr de colegi, demonstrîndu-le în laboratorul nostru metode de lucru devenite curente la noi, ne încurajează să expunem aici modesta noastră experiență.

În cele ce urmează vom descrie metode și tehnici verificate de noi, folosite în cercetările noastre. Printre aceste metode și tehnici se găsesc și unele proprii; la altele am introdus modificări care ne-au părut utile. Acolo unde va fi necesar vom indica și alte tehnici pe care nu le cunoaștem din experiență proprie, menționînd însă totdeauna acest lucru.



Întreprinderea unor cercetări sistematice de embriologie experimentală impune organizarea unui laborator special amenajat și a unei crescătorii proprii (vivariu).

Dacă este adevărat că unele intervenții asupra embrionului de găină se pot executa cu mijloace foarte simple și fără existența unui laborator special, cercetările sistematice de amploare, necesită totuși organizarea unui asemenea laborator. Dacă, în această privință, putem face unele concesii, trebuie să fim însă exigenți în ceea ce privește dezideratul amenajării unei crescătorii proprii. Experiența noastră confirmă necesitatea existenței unei surse de material experimental omogen, de proveniență cunoscută și controlabilă.

Colectivul nostru dispune de o crescătorie proprie, în care se întrețin cca. 200 de animale (păsări). Fiecare animal este inelat și posedă o fișă, în care se trec datele sale biologice: data eclozinnii și atingerii maturității sexuale, în unele cazuri chiar greutățile corporale atinse de la începutul eclozinnii pînă la maturitatea sexuală etc. O tabelă specială indică ouatul; aici se trec, pentru fiecare găină, datele depunerii ouălor și greutatea fiecărui ou. Acest lucru devine posibil grație instalării unor cuiburi ,,capcană''.

Crescătoria este prevăzută cu o instalație de incubare.

Pentru toate problemele organizării crescătoriei, alimentației (pentru adulți și puiet), ale prevenirii și tratamentului bolilor infecțioase, trimitem cititorul la indicațiile din manualele lui E. E. Penjonkievici: *Creșterea păsărilor* și A. Mauch: *Creșterea păsărilor*. Recomandăm de asemenea excelentele tratate sovietice indicate în bibliografie.

În toate aceste lucrări se găsesc și prețioase indicații în legătură cu tehnica incubării, asupra căreia nu putem insista aici. În fig. 6 și 7 prezentăm o vedere generală a crescătoriei noastre, în care se recunosc despărțiturile, instalațiile cu cuiburi de capcană etc. Figura 8 arată Laboratorul de embriologie experimentală instalat la Institutul de medicină din Timișoara, în care s-au executat majoritatea lucrărilor descrise în acest volum.

În genere este nevoie de o încăpere ferită de curenți de aer și de praf. Aerul este aici sterilizabil cu ajutorul unei lămpi de cuarț. Acest lucru se realizează în boxele care se pot vedea în fotografie. În fiecare boxă se află o masă de lucru și o masă de pregătire a materialelor, un incubator, prizele necesare (fig. 9).

Majoritatea intervențiilor nu necesită măsuri speciale de asepsie. Am renunțat la măștile de față și mînuși. Numai instrumentele care vin în contact cu conținutul ouălor sînt sterile. Puterea bactericidă a albușului este destul de mare pentru a permite acest fel de a lucra. Bineînțeles, fac excepție cercetările bacteriologice sau virologice, care necesită măsuri speciale.

PRINCIPII GENERALE ALE TEHNICII OBSERVAȚIEI VITALE

Dorința și necesitatea de a studia direct embrionul viu, de a urmări procesul de dezvoltare a unuia și a aceluiași embrion printr-o serie de observații succesive sau chiar prin observația continuă, a stat la baza elaborării unor tehnici devenite astăzi indispensabile, fie pentru studiul procesului ontogenetic normal, fie pentru urmărirea efectului unor intervenții directe sau indirecte asupra corpului embrionului sau anexelor[1]) sale.

Obiectul studiului nostru este fie embrionul fixat într-un moment dat al dezvoltării sale, deci *studiul momentului fixat* (unui moment reținut din seria de transformări prin care trece embrionul), fie cuprinderea unei succesiuni de transformări, morfologic sezisabile. În cazul al doilea ne aflăm în domeniul morfo-fiziologiei.

Trecerea de la *morfologia momentului fixat* la *morfologia procesului* se face străbătînd mai multe trepte metodologice.

Prin fixarea mai multor momente aparținînd la embrioni diferiți, în stadii evolutive diferite, sau aparținînd unor formațiuni omologe ale unuia și aceluiași embrion în stadii diferite de dezvoltare sau funcție, putem obține o primă serie, o succesiune de imagini. Dar la stabilirea numărului de ordine corect al acestor imagini, care trebuie să reprezinte seria imaginilor morfologice ale procesului pot apărea erori în stare să denatureze realitatea procesului studiat.

Un pas înainte îl constituie recoltarea și fixarea obiectelor, luate de la unul și același embrion, menținut însă în viață. În acest caz însă trebuie ținut seama de efectele multiplelor noastre intervenții.

---

[1]) „Anexele" sînt organe de cea mai mare importanță pentru dezvoltarea embrionului. Termenul nu are sensul de organ de importanță secundară.

În sfîrșit, apropierea din ce în ce mai mare a momentelor de observație pe unul și acelaș organism viu duce la obținerea unei continuități a observației vitale, cîmpul propriu-zis al morfo-fiziologiei (de exemplu, cinematografia cu *Zeitraffung*).

Morfo-fiziologia devine experimentală dacă în timpul observației sau înaintea începerii acesteia schimbăm condițiile desfășurării procesului în studiu. Nimic însă nu ne împiedică să privim morfo-fiziologia ca o fiziologie studiată cu metode morfologice.

Înregistrarea grafică a fenomenelor motorii sau electrice, urmărirea schimbărilor chimice și fizico-chimice, de exemplu, aparține metodologiei fiziologiei propriu-zise. În schimb, observația directă a schimbărilor de formă și structură macroscopice, micro-macroscopice și microscopice (eventual chiar a unor structuri ultramicroscopice) de-a lungul desfășurării procesului de dezvoltare, studiul schimbării raporturilor topografice, înregistrarea directă morfologică a creșterii și a dezvoltării, răspîndirea și deplasarea elementelor celulare, a fazelor solide și lichide etc. constituie domeniul caracteristic al morfo-fiziologiei.

Metodele morfo-fiziologice evidențiază astfel procesul fiziologic prin imaginea sa morfologică.

Posibilităților de evidențiere a fenomenelor care intră în cîmpul morfo-fiziologiei le sînt trasate anumite limite impuse de gradul de dezvoltare al tehnicii, limite care îngustează în unele domenii aplicabilitatea actuală a metodelor morfo-fiziologice. Există însă, de pe acum, multe domenii care oferă un cîmp destul de fertil și plin de perspective pentru aplicarea acestor metode.

Istoria morfologiei normale și patologice ne arată în multe cazuri (nu în toate !) parcurgerea unei faze inițiale de cercetare pe baza observației momentului fixat, urmată de obicei de faza observației vitale morfo-fiziologice. Cele mai bune rezultate s-au obținut prin justa combinare a ambelor metode.

METODE DE OBSERVAȚIE VITALĂ A EMBRIONULUI DE PASĂRE ȘI A ANEXELOR SALE *IN SITU*

Aceste metode se aplică embrionului lăsat în interiorul oului, adică al cojii, păstrîndu-și deci raporturile normale cu gălbenușul, albușul și anexele sale

OVOSCOPIA (MIRAJUL OUĂLOR)

Această metodă veche permite observația embrionului și a vaselor sale prin transparența cojii și a membranei papiracee.

Începînd din a treia zi a incubației la ouăle cu coaja subțire și albă (ouăle rasei Leghorn), ovoscopia permite vederea vaselor viteline și mai tîrziu a vaselor alantoidiene, stabilirea locului pe care-l ocupă embrionul în ou, aprecierea mărimii exacte a camerei de aer etc.

Din ziua a cincea a incubației, prin ovoscopie se pot observa contracțiile amniosului, mai tîrziu și unele mișcări ale embrionului.

Indispensabilă pentru controlul biologic al incubației, ovoscopia permite, începînd din a patra zi, diagnosticul morții embrionului sau a ouălor nefecundate.

Pentru scopurile noastre, cea mai bună metodă ovoscopică este transluminarea simplă a oului. Ne servim de o simplă cutie de lemn (fig.10)în care se află sursa de lumină (un bec electric). Oul se așază pe orificiul tăiat în fața superioară a cutiei. Obținem rezultate mai bune folosind o lampă de microscop, care posedă o diafragmă.

Pentru a obține o vedere mai clară a vaselor viteline sau a vaselor alantoidiene putem ridica (folosind o tehnică pe care o vom descrie mai departe, la ,,Ferestruirea oului'') o parte din coajă, lăsînd membrana papiracee intactă. Această membrană o putem face transparentă prin depunerea unei picături de ulei de parafină (vezi mai jos și tehnica injecției intravenoase a vaselor alantoidiene).

Prin această (ultimă) metodă se reduce permeabilitatea membranei papiracee pentru gaze și ea este deci — în primele trei zile ale incubației — dăunătoare pentru embrion. În zilele următoare, însă, scoaterea din funcție a unei suprafețe de 1 — 2 cm^2 de membrană papiracee este bine tolerată de embrion.

Metodele descrise permit deci observația indirectă a unor părți ale embrionului sau ale anexelor sale fără deschiderea propriu-zisă a oului (adică a cojii). Conținutul oului rămîne astfel ferit de infecții aerogene.

Ovoscopia este indispensabilă la alegerea ouălor fecundate începînd cu a treia sau a patra zi de incubație, la marcarea pe coajă a locului ocupat de embrion, la marcarea pe coajă a vaselor mari alantoidiene și viteline, la delimitarea camerei de aer. Vom reveni asupra importanței acestor manipulări, cu ocazia discuției tehnicii unor operații.

Pentru observația directă macro- sau microscopică a embrionului și a anexelor sale *in situ* trebuie să folosim tehnica ferestruirii oului, adică să deschidem oul, creînd un orificiu în coaja și membrana papiracee, prin care vom face observațiile și intervențiile cerute de problema pe care o urmărim.

FERESTRUIREA OULUI

Observația embrionului printr-un orificiu tăiat în coajă este o tehnică cunoscută de foarte mult timp. Prima indicație a unui asemenea procedeu datează din anul 1751 (B e g u e l i n). Modificată de G e r l a c h (1884), F é r é (1887) și W a r y n s k i, ea capătă o răspîndire foarte mare prin lucrările lui G r ä p e r (1907 — 1933), C l a r k (1920), K o p s c h (1927) U m a n s k i (1928), D a n t s c h a k o f f (1933) și alți cercetători. Cele mai importante perfecționări au fost însă aduse metodei de E. W o l f f (1936), a cărui tehnică am adoptat-o și noi în lucrările noastre.

Din motive pe care le vom expune mai jos, ferestruim ouăle în a doua zi de incubație. Este bine să însemnăm cu creionul — pe suprafața cojii — punctul culminant al oului în poziția pe care a avut-o în termostat. Acest punct indică locul ocupat de embrion sub coajă. Așezăm în fața noastră oul scos din termostat, în poziție orizontală (în aceeași poziție pe care a avut-o în incubator), pe un dispozitiv simplu, o tăbliță de lemn prevăzută cu o scobitură de formă adecvată (fig. 11). Desenăm pe coaja oului un pătrat sau un dreptunghi cu latura de 1 — $1^1/_2$ cm, avînd semnul in centrul său, locul viitoarei deschizături. Polul ascuțit al oului și regiunea viitoarei ferestre se badijonează cu o soluție diluată de tinctură de iod. Regiunea ferestrei poate fi tratată și cu o soluție de mastix sau mastisol, substanțe care împiedică împrăștierea fragmentelor de coajă în timpul ferestruirii.

Pentru a împiedica traumatizarea embrionului prin manevrele de ferestruire și de deschidere a membranei papiracee (vezi mai jos), este absolut necesar să se creeze

un spațiu de aer („camera de aer artificială") între embrion și coaja oului, respectiv membrana papiracee.

Acest lucru se obține foarte simplu, prin înțeparea polului ascuțit al oului cu o canulă de injecție obișnuită, cu ajutorul căreia vom extrage cu seringa circa 1 ml albuș din ou (fig. 12 și 13). În cazurile în care diferența dintre polul obtuz și cel ascuțit al oului nu este suficient de evidentă, ne convingem printr-un miraj prealabil de prezența camerei de aer normale a oului, care se găsește totdeauna la polul obtuz. Scoaterea albușului se face la nivelul polului oului, care nu conține camera de aer.

Noi practicăm în prealabil, cu ajutorul unui stilet steril, un orificiu cu diametrul de 1/2 mm, în coajă cam la 1/2 cm dedesubtul polului ascuțit. În acest orificiu introducem canula de aspirat albuș, avînd grijă să nu vătămăm șalaza și să nu înțepăm gălbenușul. În locul albușului scos pătrunde aer în ou și se formează un spațiu între partea culminantă a cojii cu membrana ei papiracee și embrion. Orificiul de la polul ascuțit se închide cu ceară (fig. 14).

Ne pregătim să creăm fereastra propriu-zisă.

Ne putem servi în acest scop de o simplă pilă de deschis fiole sau, mai bine, de o freză de dentist, acționată de un motor electric (fig. 15, 16). Operația se execută în doi timpi : 1) tăierea cojii oului pînă la membrana papiracee și îndepărtarea pătratului sau a dreptunghiului de coajă ; 2) deschiderea propriu-zisă, cu foarfece fin, curb, a oului prin îndepărtarea membranei papiracee. Această manevră a devenit — după instituirea camerei de aer artificiale — nepericuloasă pentru embrion (fig. 17, 18, 19 și 20).

Uitîndu-ne prin fereastra deschisă, verificăm prezența plăcii embrionare, care trebuie să corespundă — ca formă și dimensiuni — celei de-a doua zile de incubație (vezi imaginile embrionilor normali de două zile de incubație).

Acum trebuie procedat la obturarea orificiului creat. De-a lungul marginii ferestrei se așază o ramă (un cadru) formată dintr-un amestec de ceară — parafină și 1% colofoniu, în prealabil înmuiat prin încălzire la 37°. Peste această ramă se depune o lamă de sticlă încălzită, sterilă. Cele mai bune servicii fac aici lamele portobiect obișnuite (fig. 21, 22, 23 și 24). Oul este apoi repus în incubator (fig. 25).

Folosirea lamei portobiect ca mijloc de închidere a ferestrei este practică prin faptul că aceste lame nu se sparg atît de ușor ca lamelele, pot fi reîntrebuințate și permit o mînuire ușoară a oului ferestruit. Am renunțat la întrebuințarea lamelelor, celofanului sau plăcilor de mică, recomandate în literatură. Ori de cîte ori este nevoie de a redeschide fereastra, aplicăm o spatulă de metal încălzită pe suprafața lamei portobiect. Încălzită astfel, lama se detașează ușor de rama de ceară, parafină, care trebuie să rămînă însă pe loc.

E. W o l f f a observat că, începînd cu a 15-a oră de incubație, gălbenușul, cu discul embrionar totdeauna îndreptat în sus, se urcă venind în contact cu membrana papiracee. Între membrana vitelină, care acoperă direct embrionul și membrana papiracee, rămîne astfel numai un strat capilar de albuș. În această situație, discul embrionar beneficiază, direct și fără pericolul uscării, de oxigenul care pătrunde prin porii cojii și membrana papiracee. Urcarea gălbenușului în această perioadă de dezvoltare corespunde necesităților respiratoare ale embrionului. Scufundarea în albuș (sau alt lichid) a discului embrionar, în primele două zile de incubație, duce la asfixia și moartea embrionului. De aceste fapte trebuie să ținem seama cînd ferestruim oul în primele două zile ale incubației.

După ce am deschis oul și am acționat asupra conținutului lui, este necesar să reumplem oul cu albușul în prealabil scos, cînd operăm în primele două zile ale incubației.

Crearea unei camere de aer persistente deasupra discului embrionar ar permite (după W o l f f), *în primele două zile* de incubație, emergența unei calote a gălbenușului deasupra nivelului albușului, ceea ce ar provoca uscarea (vătămătoare) a embrionului. Prin reumplerea oului putem evita acest mare defect al vechilor tehnici (E. W o l f f).

Spre sfîrșitul celei de a doua zile de incubație și mai cu seamă începînd cu a treia zi, această precauție nu mai este necesară. Cum remarcă foarte just W o l f f, după instalarea circulației și scufundarea corpului embrionului între cutele amniotice, pericolul uscării dispare.

Este suficient de a închide — cum am arătat la început — orificiul tăiat în ou, lăsînd să persiste camera de aer artificială deasupra embrionului.

Toți experimentatorii au constatat că intervențiile în primele 48 de ore de incubație sînt teratogene. Chiar simpla ferestruire a oului, depunerea unei picături de apă pe placa embrionară, o ușoară uscare a membranei viteline deasupra embrionului, pot duce la malformații.

Cele mai frecvente sînt, după E. W o l f f : microftalmia, anoftalmia, anencefalia, celosomia. Putem adăuga din propria noastră experiență, și întreruperea legăturii dintre inimă și vasele extraembrionare, despre care va fi vorba în capitolele următoare.

După 30 de ore de incubație, efectul teratogenetic, în urma deschiderii oului, devine minim. Din această cauză, noi executăm majoritatea intervențiilor noastre în a treia zi de incubație, ferestruind ouăle în a doua zi de incubație. Procedînd astfel se obține o supraviețuire pînă în a doua jumătate a perioadei de incubație aproximativ a unei jumătăți din numărul embrionilor.

Mortalitatea depinde evident, și de felul intervenției la care supunem embrionul după ferestruire.

Simpla ferestruire după a doua zi de incubație asigură — după cum afirmă E. W o l f f (ceea ce confirmă și experiența noastră) —o supraviețuire a mai mult de jumătate din numărul embrionilor peste a 15-a zi de incubație. Aproximativ a 20-a parte a ouălor ferestruite eclozează. Putem confirma că, o dată depășită a opta zi de incubație, embrionii vor atinge, în majoritatea cazurilor, a 15-a, a 16-a zi de incubație în viață. Crize de mortalitate importante se observă în jurul celei de a opta zile de incubație și în ultimele zile de incubație (cînd mortalitatea devine deosebit de mare).

O tehnică deosebit de interesantă a fost descrisă recent de M. H a ș e k. Se ferestruiesc două ouă — aparținînd la rase sau specii diferite de păsări — în vîrstă de 8 — 9 zile de incubație, cînd membranele alantoidiene au ajuns la maturitate funcțională. Ouăle ferestruite sînt apoi împreunate la nivelul ferestrelor, producîndu-se sudarea cu comunicare sanguină a celor două membrane corion-alantoide. Se realizează astfel o adevărată parabioză între cei doi embrioni (cele două complexe embrionare).

Metoda este utilă pentru studiul hibridării vegetative, studii imunobiologice etc.

DISPOZITIVE DE OBSERVAȚIE MICRO-MACROSCOPICĂ ȘI MICROSCOPICĂ A EMBRIONULUI VIU *IN SITU*

După deschiderea ferestrei nu ne mulțumim bineînțeles numai cu observația embrionului cu ochiul liber. Așezăm oul deschis, fixat pe suportul său, sub o lupă binoculară. O sursă de lumină diafragmabilă așezată lateral asigură vederea cît mai clară a

amănuntelor (fig. 26). Răcirea oului scos din incubator nu trebuie să ne neliniștească. Această răcire este bine suportată la temperatura camerei, prelungindu-se chiar peste o oră. Mai periculoasă este uscarea suprafeței embrionului, respectiv a membranei viteline. De aceea vom scurta cît mai mult timpul de observație cu fereastra deschisă. Suprafața membranei viteline o vom umecta din cînd în cînd cu albuș scos din același ou. Cele mai bune rezultate le dau lupele binoculare, care posedă un cîmp vizual larg și o distanță obiectiv-obiect destul de mare, permițînd introducerea prin fereastră, sub controlul lupei, a diferitelor instrumente operatoare. Acest lucru este bineînțeles posibil numai în cazul folosirii obiectivelor cu putere măritoare redusă.

Această instalație, așezată în apropierea incubatorului, este suficientă pentru majoritatea intervențiilor și observațiilor de control descrise în capitolele ce urmează.

Dacă sînt însă necesare observații continue de mai lungă durată sau o succesiune de observații (de lungă durată), cînd trebuie luate fotografii în serie ale unor faze succesive de dezvoltare, se impune folosirea unui microtermostat de ou (fig. 27, 29, 30 și 31). Acesta permite păstrarea temperaturii de 38° și a umidității necesare incubației și în acelaș timp observația microscopică a conținutului oului deschis. Pentru a putea folosi obiectivele măritoare puternice, suprafața observată trebuie acoperită cu o lamelă, cînd ne folosim de un microscop obișnuit. În aceste condiții de lucru, distanțele dintre obiectiv și obiect devin din ce în ce mai mici; obiectivul microscopului trebuind să fie introdus prin fereastra oului, iluminația laterală obișnuită devine imposibilă. Aici se impune folosirea microscopului ultropac (fig.28). Aceasta permite examenul prin lumina reflectată chiar la distanțe obiect-obiectiv foarte mici, lumina de observație fiind introdusă în ou prin însuși tubul microscopului. Posibilitatea de a modifica poziția epicondensorului acestui microscop (fig. 27), față de obiectivul său, permite și obținerea iluminației laterale, aproape tangențiale, cu efecte de ultramicroscop.

În ambele moduri de lucru — microscop sau ultropac — montarea unei camere fotografice cu oglindă de reflexie pe tubul microscopului permite luarea unor serii fotografice la distanțe voite (fig. 29). Nu ne-am servit încă de microcinematografia fazelor dezvoltării embrionului.

Trebuie să menționăm aici interesantele dispozitive pentru observația microscopică a embrionului de găină viu, *in situ*, în primele stadii de dezvoltare, descrise de O. B. Lepeșinskaia și E. P. Lapisova, pe de o parte, și V. I. Sorokin, pe de alta.

La dispozitivul Lepeșinskaia-Lapisova (fig. 32, 33) se folosește o fină membrană de cauciuc, în centrul căreia se află un orificiu prevăzut cu o lamelă de celuloid. Această lamelă se aplică pe suprafața embrionului și a ariei sale vasculare, devenită accesibilă prin depărtarea unei calote a cojii. Oul astfel pregătit se așază într-un termostat. iar observația microscopică se face cu microscopul obișnuit sau cu microscopul ultropac, al cărui obiectiv se introduce printr-un orificiu în capacul termostatului.

Dispozitivul lui V. I. Sorokin (fig 34) este ceva mai complicat. Aci există un sistem de încălzire cu apă a recipientului care conține oul ferestruit și a obiectivului microscopului, iar iluminația se face prin partea inferioară a gălbenușului, printr-un al doilea orificiu tăiat în ou, după cum se vede din figură.

Servicii însemnate poate aduce observarea la lumina ultravioletă filtrată Wood. Ne folosim de o instalație destul de simplă, compusă dintr-o sursă obișnuită de lumină ultravioletă (lampă de cuarț) prevăzută cu un filtru Wood (fig.35). Radiația este proiectată lateral asupra embrionului, deasupra căruia fixăm dispozitivul fotografic. Un filtru galben în fața obiectivului aparatului fotografic permite accesul spre pelicula

fotografică numai a părții vizibile a spectrului de fluorescență stîrnit de razele ultraviolete, ele însele fiind reținute de filtrul galben.

Această metodă ne-a permis să studiem (împreună cu C. Rîmniceanu și C. Miclea) fluorescența mezo-și metanefrosului și a altor organe la embrionul de găină (fig. 36).

COLORAȚIA VITALĂ A EMBRIONULUI ȘI A ANEXELOR SALE

Oricît de interesantă ar fi observația vitală nativă a țesuturilor embrionare vii (la diferite măriri), se impune totuși crearea unor contraste artificiale prin colorații vitale, fără care observația pe viu a unui mare număr de amănunte ar rămîne imposibilă.

Colorația vitală a embrionului de găină a fost introdusă în tehnica embriologică experimentală de Gräper (1904). Ca substanțe colorante servesc deobicei roșul neutru sau albastrul de Nil (sulfat sau clorhidrat). Acești coloranți pot fi folosiți în soluție apoasă 1/1000 — 1/100, în soluție fiziologică (sau Ringer, Tyrode) sau încorporați în purtător de colorant, de obicei agar.

Soluțiile apoase le folosim numai în anumite cazuri speciale, cînd dorim să colorăm embrionul întreg. Am observat că embrionii de o zi sau două de incubație suportă bine colorație totală cu roșu neutru, care se obține depunînd 2 — 3 picături din soluția 1/1000 pe suprafața plăcii embrionare. În urma unei asemenea colorații, embrionul se dezvoltă normal mai departe, ceea ce însă nu se întîmplă cînd folosim soluția de albastru de Nil, care după experiența noastră, aplicată în aceste condiții, este toxică.

Colorația vitală a țesuturilor embrionare apare repede și o putem urmări prin binocular. Se colorează de fapt numai incluzii intracelulare, ca vacuole, picături lipidice, plăcuțe viteline (fig. 37).

Formațiunile embrionare se conturează din ce în ce mai bine în funcție de concentrația colorantului și de numărul celulelor care absorb colorantul pe suprafața incluziilor sau granulațiilor preexistente (fig. 38, 39, 40 și 41).

În afara efectului de evidențiere, colorațiile vitale sînt și indicatori de pH, embrionul acid colorîndu-se de exemplu cu roșu neutru în roz, albușul alcalin în portocaliu.

Alți coloranți ne informează asupra potențialului oxidoreductor al substratului [albastru de metilen, verde Janus (toxic !) etc.].

În toate cazurile însă cînd trebuie să operăm într-o regiune delimitată a embrionului ne folosim — pentru o evidențiere clară a cîmpului operator — de tehnica portcolorantului de agar. (Portcoloranții au fost introduși în embriologia experimentală de Vogt).

Înglobînd substanța colorantă într-o masă de portcolorant, din care poate difuza spre substrat și căreia i se poate da orice formă dorită, putem limita procesul de colorație înăuntrul granițelor unei regiuni de formă și dimensiuni dorite de noi.

În soluția de 2% agar în apă distilată (sau ser fiziologic) se introduce colorantul în proporție de 0,5 — 0,1%. Fierbem și turnăm masa de agar, în care colorantul s-a dizolvat complet, într-o cutie Petri sterilă. După răcirea și închegarea agarului, portcolorantul este gata de întrebuințare. Tăiem din masa de agar, cu ajutorul unui ac de sticlă curb și steril, un mic fragment de formă și dimensiunile corespunzătoare scopului nostru (1 mm^3 sau mai puțin), ridicăm fragmentul din cutia Petri cu ajutorul aceluiași ac și îl depunem pe suprafața membranei viteline peste regiunea în care dorim să intervenim. Începătorul face această operație cu ajutorul lupei binoculare, însă după cîteva exerciții depunerea

reușește și cu ochiul liber. Colorantul va difuza din blocul de agar prin membrana vitelină în țesuturile embrionare subiacente, care se colorează exact în porțiunea acoperită de port-colorant (fig. 41).

După ce am pus blocul de agar pe locul ales, închidem fereastra cu lama și repunem oul în termostat, unde rămîne circa 10 minute. Acest timp depinde de concentrația colorantului în portcolorant. După aceea oul este repus din nou sub binocular, se deschide fereastra și se observă blocul de agar și embrionul. Dacă colorația a fost prea intensă, se produce o difuziune a colorantului, antrenat de curentul sanguin, de-a lungul vaselor viteline, a căror albie apare colorată. Greutatea prea mare a blocului de agar poate să producă o stază în jurul capilarelor apăsate. Prelungirea peste un sfert de oră a șederii blocului de agar pe corpul embrionului poate produce o necroză a porțiunilor subiacente (vezi capitolul „Amputări"). Pentru îndepărtarea portcolorantului este necesar să umectăm cu puțin albuș luat cu un ac de sticlă din acelaș ou. Apoi, cu ajutorul acului curb sau cu o pensă fină de oculist (vezi mai departe în capitolul „Operații") ridicăm blocul de agar fără a vătăma suportul său, membrana vitelină.

Apar acum efectele difuzării colorantului înspre țesuturile embrionare. Uneori tot colorantul a părăsit blocul de agar, producîndu-se o intensă colorație a membranei viteline, ceea ce împiedică vizibilitatea prin transparență a părților subiacente. În acest caz închidem fereastra, repunem oul în incubator și așteptăm cîteva minute, pînă cînd colorantul a difuzat mai departe în adîncime. Putem inciza (vezi capitolul „Intervenții") membrana vitelină supracolorată care — îndepărtîndu-se ca o cortină — descoperă embrionul subiacent.

Dacă avem impresia că embrionul este insuficient colorat, așteptăm încă cîteva minute, în care timp de obicei colorația se intensifică. Nu trebuie să ajungem pînă la colorația intensă „de preparat" a organelor embrionare, ci să ne mulțumim (în interesul supraviețuirii normale a embrionului) cu o fină indicație a contururilor.

Colorația persistă de obicei peste 24 de ore, după care timp dispare treptat, fără a lăsa urme. Ea este limitată la locul aplicării portcolorantului și asigură vederea clară a regiunii operatoare și prin aceasta executarea precisă a microoperațiilor.

Mărcile colorate, folosite în limita indicațiilor date, au fost totdeauna foarte bine tolerate de embrion, fără a produce efecte toxice sezisabile.

TEHNICI DE INCUBAȚIE ȘI OBSERVAȚIE A EMBRIONULUI SCOS DIN COAJĂ

Aceste tehnici permit observația, nestingherită de prezența cojii, a întregului conținut al oului.

TRANSVAZAREA OULUI

În a doua zi de incubație, cînd principala perioadă teratogenetică, despre care am vorbit înainte, a trecut, conținutul oului poate fi vărsat într-un recipient artificial și incubat mai departe în afara cojii. Adoptînd tehnica lui H e l l m e r, procedăm, în acest scop, în felul următor:

Ouăle din a doua zi de incubație sînt șterse cu alcool diluat. Perforăm coaja la nivelul camerei de aer și începem să îndepărtăm coaja cu o pensă, bucată cu bucată, avînd grijă să nu atingem gălbenușul. Cînd orificiul creat astfel în coajă a căpătat dimensiuni care

depășesc diametrul gălbenușului, îndepărtăm colțurile periculoase ale marginii deschizăturii și vărsăm întregul conținut al oului (imitînd gestul gospodinei) într-un recipient emisferic de sticlă steril cu diametrul de 5 cm (fig. 42).

Este important să așezăm în așa fel gălbenușul în recipientul de sticlă, încît placa embrionară să se găsească pe emisfera superioară, văzută de operator (orice altă poziție duce la asfixierea embrionului sau la malformații).

După cîteva încercări învățăm să plasăm gălbenușul în poziție corectă (cu embrionul în sus) în recipient. În cazul în care poziția gălbenușului nu ne mulțumește, îl putem răsturna încă o dată sau chiar de mai multe ori în alte recipiente pregătite, pînă cînd obținem poziția corectă. În nici un caz nu trebuie să provocăm ruperea membranei viteline — accident urmat inevitabil de formarea unui extraovat, adică scurgerea unei părți a vitelusului în albușul înconjurător, ceea ce tulbură dezvoltarea normală. În a doua zi de incubație, cînd executăm această transvazare a oului, membrana vitelină este încă suficient de groasă pentru a rezista la asemenea solicitări [1]). Grosimea membranei descrește începînd cu prima zi de incubație. În a treia zi ea s-a subțiat mult și astfel pericolul de a o rupe devine mult mai mare dacă operăm în această zi.

Recipientul conține acum gălbenușul bine orientat, plutind în albușul turnat împreună cu el. Așezăm recipientul într-un cristalizator înalt (fig. 42), în fundul căruia se află un strat de apă caldă de circa 1 cm înălțime. Acoperim cristalizorul cu un capac de sticlă și îl așezăm în incubator.

Această tehnică permite de obicei supraviețuirea embrionului pînă în a cincea — a șaptea zi de incubație (rareori mai mult). Ea are avantajul de a expune vederii și manipulării nestingherite embrionul cu anexele sale (fig. 43), permite urmărirea formării lichidului subembrionar etc.

Pentru a putea examina prin transparență și cu obiectivele puternice ale microscopului obișnuit orice parte a suprafeței embrionului viu și a membranelor sale (circulația, amănunte histologice etc.), am construit, împreună cu St. Elias, următorul dispozitiv experimental:

Embrionul de trei zile de incubație, împreună cu aria sa vasculară, se separă de întreaga masă de vitelus și se întinde pe convexitatea unei sticle de ceasornic sterilă. Pentru a separa embrionul și aria sa vasculară intactă de restul sacului vitelin și de masa gălbenușului, deschidem oul și vărsăm conținutul său într-un cristalizor cu soluție fiziologică sterilă și caldă. Conținutul oului plutește acum în lichid. Prindem cu o pensă sterilă sacul vitelin și cu ajutorul unui foarfece curb, tăind mereu în afara sinusului marginal, reușim să detașăm o membrană care conține embrionul și întreaga sa arie vasculară. Introducem acum sticla de ceasornic în lichidul din cristalizor (aci se recomandă folosirea unor mănuși sterile și a măștii de față), apoi cu cîteva mișcări ale pensei reușim, de obicei fără prea mari dificultăți, să aducem formațiunile embrionare în dreptul convexității sticlei de ceasornic pe care o ridicăm brusc, scoțînd-o împreună cu embrionul din apă. În felul acesta obținem o bună așezare a embrionului și a anexelor sale pe noul său suport, pe care-l introducem imediat într-o cameră umedă (fig. 44), prevăzută cu un dispozitiv de umectare. Camera umedă se menține la temperatura de incubație în termostat.

Metoda discului embrionar izolat pe medii de cultură a fost descrisă de Waddington, Spratt, Rudnick etc. Doris Simon descrie recent experiențe pe discuri explantate *in vitro*.

---

[1]) Membrana vitelină se subțiază și se resoarbe în primele zile de incubație.

În felul acesta se pot menține circulația sanguină și viața întregii formațiuni embrionare 24 de ore, uneori chiar mai mult. Putem examina la orice măritor, chiar și cu imersie — depunînd o lamelă sterilă pe suprafața de examinat — orice regiune a suprafeței formațiunii embrionare vii astfel preparate.

Putem depune embrionul cu aria sa vasculară pe o lamă plană, care se introduce în microtermostatul „de lamă" (fig. 45, vezi și „Culturi de țesuturi"). Grație acestui dispozitiv îl putem observa la temperatura de 38°, cu microscopul obișnuit sau cu ultropacul. Se pot lua fotografii în serie (fig. 46).

DESPRE INTERVENȚIILE DIRECTE ȘI INDIRECTE ASUPRA EMBRIONULUI DE GĂINĂ ȘI A ANEXELOR SALE

Metodele de intervenție folosite în embriologia experimentală s-au împărțit de obicei în metode generale, prin care se acționează asupra întregului complex embrionar, și metode zise „locale", îndreptate de la început asupra unor porțiuni morfologic sau funcțional delimitate. Printr-o intervenție „generală" se poate acționa însă electiv asupra unei regiuni delimitate sau paralel asupra mai multor regiuni, de pildă asupra unui organ embrionar deosebit de sensibil la acțiunea unui anumit agent, considerat însă ca avînd o acțiune generală. Această electivitate nu trebuie să se manifeste numai la o formațiune anatomic delimitată, ci poate privi un sistem biochimic și funcțional specializat.

Invers, metodele zise „ directe", care se adresează de la început unor regiuni delimitate, vor putea avea și repercusiuni generalizate prin corelațiile regiunii primitiv afectate cu restul complexului embrionar, în raport cu poziția pe care o ocupă partea afectată în momentul intervenției (și mai tîrziu) în sistemul de interacțiuni care leagă într-un tot unitar elementele constitutive ale complexului embrionar.

Intervențiile directe, folosind mijloace mecanice, termice, chimice, radiații etc. executabile pe embrionul de găină (pe corpul sau pe anexele sale), sînt de mult timp cunoscute.

Scymkiewicz (1875), Warynski și Fol (1884) au descris intervenții mecanice (incizii) sau cauterizări cu acul fierbinte în scopul de a obține experimental malformații. Lillie (1903) folosește electrotermocauterul, Gräper (1907—1933) operează cu ajutorul colorației vitale, Dantschakoff și Bereskina (1931) distrug cu galvanocauterul regiunea gonocitelor primordiale, Szepsenwohl (1933) reia tehnicile teratogene ale lui Warynski, perfecționîndu-le, Clark (1920) și mai cu seamă Kopsch (1927) dezvoltă tehnica distrugerilor locale electrolitice, Tchachotin (1912—1920—1921) descrie tehnica leziunilor prin aplicația localizată a razelor ultraviolete („microînțepătură" cu un fascicul fin de raze ultraviolete). Benoit (1930) iradiază teritoriile localizate ale embrionului de găină cu raze ultraviolete, folosindu-se de ecrane găurite, depuse pe placa embrionară. Lacassagne și Deselin se folosesc (1928) de radiația emisă de substanțe radioactive (poloniu); Dantschakoff și Bereskina (1931) de radon. E. Wolff iradiază porțiuni localizate ale embrionului de găină cu raze röntgen, folosindu-se de ecrane găurite (1936).

Această listă sumară și incompletă (există un număr foarte mare de lucrări asupra intervențiilor directe pe embrionul de găină) evidențiază numai principalele tehnici directe folosite pînă acum.

În ceea ce privește metodele generale, ele au fost primele întrebuințate, fiindcă nu necesitau tehnici complicate, devenite aplicabile abia mai tîrziu. D a r e s t e a obținut experimental o serie de malformații la găină prin încălziri, răciri, agitări sau vernisajul ouălor. (Embriologia experimentală datorează foarte mult metodelor de teratologie experimentală). Multe din cunoștințele pe care le avem astăzi asupra desfășurării formale și cauzale a ontogenezei embrionare s-au obținut prin folosirea unor asemenea metode.

Expunerea oului întreg la diferite condiții de iluminare, modificarea ambianței gazoase a oului, a temperaturii de incubație, a umidității și presiunii atmosferice etc., injectări de substanțe toxice sau biologic active (hormoni etc.), schimbarea condițiilor de viață (hrană etc.), ale organismelor parentale vor putea afecta embrionul întreg (sau electiv anumite părți ale embrionului), modificîndu-i metabolismul și prin acesta procesul de dezvoltare.

Astfel, printre inițiatorii folosirii hormonilor în embriologia experimentală se află acad. C. I. P a r h o n. Colectivul condus de acad. V. D. M î r z a studiază efectul modificării condițiilor externe asupra dezvoltării embrionului.

De cea mai mare importanță este momentul aplicării experimentale a agentului modificator, fie „general", fie „local" (acești termeni înțeleși în sensul de mai sus), natura și raporturile interacțiunilor schimbîndu-se în complexul embrionar la fiecare treaptă de dezvoltare.

Ocupînd o poziție metodologică intermediară între metodele „directe" și cele „indirecte", transplantările embrionare merită o mențiune deosebită. Tehnica transplantărilor embrionare s-a dezvoltat mai cu seamă grație influenței școlii speemanniene (după descoperirea efectului de inducție). Dar și studiul experimental al unui mare număr de alte probleme biologice a beneficiat de tehnica heterotransplantărilor de organe embrionare pe gazde embrionare (în domeniul oncologiei, imunobiologiei și geneticii, în probleme de localizare și de diferențiere etc.).

Metodele de dirijare a ontogenezei aplicate de M i c i u r i n și școala lui au deschis embriologiei experimentale, în ultimii ani, un nou și vast domeniu de dezvoltare, cu perspectiva unei legături fructuoase între teorie și practică.

Considerînd faza embrionară a ontogenezei ca cea mai plastică față de modificările condițiilor de dezvoltare, atenția biologilor experimentatori a fost din nou îndreptată asupra intervențiilor în sistemul de interrelații al complexului ontogenetic.

Sub îndemnul școlii miciuriniste au apărut interesantele metode de recombinare experimentală a complexului embrionar din constituenți aparținînd la parteneri de rasă sau specie diferită, cum ar fi de pildă : introducerea gălbenușului într-un oviduct străin, unde capătă un strat de albuș heterorasial sau chiar heterospecific, așezarea embrionului vegetal (cereale) pe un heteroendosperm, schimburile de albuș în ou, introducerea ovulelor fecundate în oviducte străine la mamifere, transplantările de ovare întregi etc.

Dezvoltarea metodelor biochimice (B r a c h e t, N e e d h a m, W a d d i n g t o n, D o r f m a n), apoi a metodelor biofizice (îndeosebi, folosirea izotopilor radioactivi etc.), iar în ultimul timp dezvoltarea embriologiei imunologice, deschid embriologiei experimentale noi perspective.

Față de aceste metode moderne, metodele mai vechi, la care embrionul este trecut „prin foc și sabie" (intervențiile mecanice și cauterizările), par — la prima vedere — primitive și poate chiar perimate.

Atribuind metodelor de analiză sau intervenție în procesele intime — metabolice — cea mai mare importanță, ne exprimăm totuși convingerea în persistența utilității celorlalte

metode și tehnici de cercetare, care se adresează structurilor mai grosolane ale embrionului. După părerea noastră, acestea sînt încă departe de a-și fi epuizat posibilitățile de aplicare.

O încercare de sistematizare a metodelor și tehnicilor folosite în embriologia experimentală se poate face folosind drept criteriu domeniul structural, căruia i se adresează inițial aceste tehnici (fig. 47).

Astfel se delimitează grupul metodelor de intervenție în domeniul micro-macroscopic, microscopic și ultramicroscopic („leptonic"). Acesta din urmă reprezintă tocmai etajul structural în care se petrec schimbările metabolice. Într-o anexă, la sfîrșitul capitolului, vom dezvolta mai departe acest principiu de sistematizare al metodelor și tehnicilor.

METODE DIRECTE MECANICE

Incizii, înțepături, exereze de porțiuni de organe sau țesuturi, mișcări impuse porțiunilor mobile etc., le executăm cu ace de sticlă pregătite *ad hoc* (se pot întrebuința și anse fine de sîrmă sau de păr (vezi „Termocauterizări").

Cel mai bun material de lucru pentru scopul nostru îl constituie tuburile de sticlă avînd un diametru de 2—3 mm.

La flacăra lămpii de spirt sau la flacăra mică a becului Bunsen, încălzim un tub de circa 10 cm lungime la mijlocul lui și „tragem" în mod obișnuit un capilar de sticlă (fig. 48 și 49). Rupînd în două partea capilară obținută, avem două instrumente ale căror vîrfuri trebuie prelucrate. Apropiind (fig. 50, 51 și 52) vîrfurile împreunate ale ambelor instrumente de periferia părții inferioare a flăcării slabe (fiecare mînă ține cîte un instrument), lăsăm să se producă topirea și alipirea lor. Printr-o mișcare bruscă de îndepărtare a acestor vîrfuri — acum contopite — se formează o punte fină de legătură, pe care o rupem după răcire, obținînd în felul acesta „croșetul" sau „acul operator" (eventual cu perlă) pentru incizii și înțepături. Dimensiunea și finețea acestuia depind de timpii de manipulare și sînt indicate de natura operației pe care dorim să o executăm.

„Instrumentul bont" (îndepărtătorul) se obține apropiind din nou de flacără vîrful fin și ascuțit al acului operator, obținut prin procedeul descris. Acest vîrf se transformă, topindu-se, într-o perlă căreia îi putem da dimensiunile dorite (fig. 53). Pentru a le ține sigur în mînă, este bine să dăm acestor instrumente un „mîner" lung de 12—13 cm.

Un alt instrument util este pipeta de aspirație sau de injecție, formată, în mod simplu, dintr-un tub de sticlă lung de 10—12 cm cu vîrful efilat capilar (finețea capătului capilar depinde de lichidul sau corpurile care trebuie aspirate sau injectate). La celălalt capăt al tubului aplicăm un tub de cauciuc, fie în legătură cu o seringă, fie ținut în gură, cînd mînuim în același timp, sub controlul lupei binoculare, vîrful capilar în contact cu părțile embrionare care ne interesează.

Pipeta poate fi montată și pe dispozitivul nostru de operații cu instrumente fixe.

Instrumentele descrise nu sînt unelte de micromanipulare propriu-zisă. Acestea se folosesc pentru intervenții mult mai fine, citologice, deci la nivel morfologic celular. Instrumentele descrise mai sus se aplică domeniului formelor micro-macroscopice.

Prin apăsări localizate putem obține atrofii sau necroze de porțiuni delimitate ale corpului embrionului sau ale anexelor sale. Ne folosim de mici bucățele de plumb sterilizate, de blocuri de agar etc., pe care le lăsăm să apese regiunea asupra căreia dorim să acționăm.

Scurte loviri cu perla acului bont produc staze capilare și sufuziuni sanguine. Staze capilare se produc și dedesubtul unor corpuri care apasă. Putem obține de asemenea staze capilare localizate prin depunerea unor cristale de clorură de sodiu sau a altor substanțe solide solubile în apă.

Porțiuni pediculate (membre, capul, vezicula alantoidiană etc.) pot fi prinse într-un nod deschis, care se strînge treptat. Folosindu-ne de fire de mătase sterilizate sau nylon, putem obține în felul acesta atrofia sau necroza acestor porțiuni.

Tracțiuni mecanice se pot produce asupra pereților unor organe cavitare (vezicule cerebrale, alantoida etc.) introducînd în aceste cavități o picătură de mercur, care prin greutatea ei va exercita o tracțiune asupra pereților acestor organe cavitare.

Amintim aici (nu avem experiență personală) introducerea de *pilitură de fier* în anumite părți ale corpului embrionului, supuse apoi unor tracțiuni ritmice de către un electromagnet.

METODE TERMICE

ELECTROTERMOCOAGULAREA

Microcauterul de care ne servim este fie o ansă de platină, prevăzută cu un vîrf operator de formă convenabilă, adaptată regiunii în care intervenim, fie o ansă metalică foarte fină de cupru sau constantan, cu diametrul de 0,03 mm.

În primul caz, vîrful operator primește căldura transmisă (încălzire indirectă) de la ansa pe care este aplicat ; în al doilea caz, întreaga ansă este încălzită direct și are dimensiunile cerute unui microinstrument (fig. 54 și 55).

Instrumentele sînt alimentate cu un curent electric de încălzire, reglat de o rezistență variabilă.

Cauterele sînt aduse în contact cu țesuturile embrionului sub controlul lupei binoculare, fie montate pe dispozitivul portinstrument, fie ținute în mînă.

Se poate lucra în două feluri : putem încălzi instrumentul pînă la temperatura dorită, realizînd apoi contactul cu formațiunile care trebuie cauterizate, sau încălzirea se face treptat după realizarea acestui contact.

Colorația vitală prealabilă a țesuturilor ne este aici de un mare folos, fiindcă ea permite o localizare exactă a intervenției și aprecierea întinderii procesului de necroză obținut în urma cauterizării. Părțile colorate cu albastru de Nil virează în timpul coagulării spre o nuanță verzuie.

Variind încălzirea instrumentului putem obține diferite efecte, mergînd de la ușoare vătămări pînă la distrugeri totale, de întindere variabilă.

ELECTROCOAGULAREA (ELECTROLIZA)

În acest caz, efectul este obținut prin fenomenele care se petrec la anod sau catod, într-un circuit de curent continuu.

Noi ne folosim de un dispozitiv simplu alimentat de o baterie obișnuită. Polul „inactiv" (cu suprafața mai mare) este introdus în albuș, iar polul „activ" (de obicei catodul) vine în contact cu regiunea operatoare (fig. 56).

Aci acțiunea este însă greu controlabilă și greu dozabilă ca întindere și intensitate. Această tehnică expune embrionul la adevărate electroșocuri.

Se poate lucra și cu un instrument compus din două ace de cusut de oțel juxtapuse, izolate cu lac pînă la vîrfuri, care rămîn libere (K o p s c h).

DISTRUGERI LOCALIZATE CU AJUTORUL IRADIERII CU RAZE ULTRAVIOLETE

Ne servim de o sursă de raze ultraviolete cu care iradiem, prin fereastra deschisă, suprafața embrionului sau a membranelor. Pentru a localiza efectul, acoperim suprafața plăcii embrionare cu o foiță de staniol, prevăzută cu un orificiu, prin care se expune regiunea asupra căreia dorim să intervenim. Cu sursa folosită de noi obținem la o distanță de 20 cm în 8 minute, vătămarea mezodermului extraembrionar sau malformația capului embrionului.

FABRICAREA ȘI MÎNUIREA MICROINSTRUMENTELOR

Instrumentele pe care le-am descris mai sus pot fi acționate cu mîna, cîmpul operator rămînînd fix ; sau invers, putem fixa instrumentele, mișcînd cîmpul operator.

Mișcarea instrumentelor operatoare cu ajutorul micromanipulatorului o facem numai excepțional pentru aceste genuri de operații, micromanipularea rămînînd rezervată intervențiilor la nivelul celular.

Pentru a mînui microinstrumentul, așezăm oul deschis sub lupa binoculară, potrivim iluminația și ducem sub controlul ochiului liber, cu mîna dreaptă, instrumentul în dreptul regiunii operatoare. După aceea, ținînd instrumentul în poziția controlată întîi cu ochiul liber, ne uităm în binocular și căutăm să obținem vederea simultană a regiunii operatoare și a instrumentului. Abia acum poate să înceapă intervenția propriu-zisă. În timpul lucrului, mîna operatoare, care ține instrumentul, trebuie să fie sprijinită. Acest lucru se obține fie prin contactul mîinii cu tija lupei binoculare și susținerea cotului de un suport adecvat, fie (mai bine) sprijinind mîna dreaptă cu mîna stîngă, care cuprinde articulația ei radio-carpiană (fig. 57).

Pentru a evita efectul unor tremurături involuntare, putem lucra cu sistemul instrumentelor fixe, respectiv al cîmpului operator mobil. În acest scop am construit un dispozitiv (fig. 58 și 59) care permite fixarea microinstrumentelor în poziția dorită și în același timp mișcarea cîmpului operator (oul sau preparatul) cu ajutorul vizelor. În unele cazuri putem monta microinstrumentele și microcauterul pe brațele micromanipulatorului (fig. 60, 61, 62, 63, 64 și 65).

TEHNICA DIFERITELOR INJECȚII ÎN CORPUL EMBRIONULUI, ÎN ANEXELE SALE ȘI ÎN APARATUL CIRCULATOR

De multe ori se ivește necesitatea de a injecta diverse substanțe, fie în cavitățile preformate ale corpului embrionului, fie în diferite spații extraembrionare. Unele probleme cer executarea fie de injecții intravasculare (intravenoase sau intraarteriale), fie prelevări

de sînge din circulație la diferite vîrste ale embrionului. Trebuie executate uneori și injecții interstițiale în țesuturile sau organele corpului embrionar (fig. 66) sau în țesuturile membranelor extraembrionare.

INJECȚII SAU SCOATERI DE ALBUȘ

Scoaterea albușului în primele zile ale incubației o facem fie pentru crearea camerei de aer artificiale (vezi subcapitolul „Ferestruirea oului"), fie pentru a cerceta constituția biochimică și biofizică a albușului în timpul incubației la unul și același ou, fie, în sfîrșit, pentru a executa schimburi de albuș, respectiv înlocuirea albușului scos cu albușul luat de la alt ou de altă rasă sau chiar altă specie. Această metodă de lucru s-a răspîndit în urma lucrărilor lui Bogoliubski, Mastaler și Ferdinandov și ale altor autori care au obținut, prin acest schimb de albuș interrasial sau interspecific, o creștere a vitalității puilor eclozați sau fenomene de hibridare vegetativă.

Cea mai simplă tehnică recomandată constă în crearea unui orificiu în apropierea polului ascuțit al oului, care permite introducerea unei canule metalice groase, depășind cu puțin diametrul exterior al acestei canule. După ce am încărcat seringa sterilă cu albușul de injectat și am montat canula pe seringă, o introducem în orificiu, păstrînd contactul orificiului canulei cu fața internă a membranei papiracee. Albușul străin se injectează foarte încet permițînd ca propriul albuș deplasat să iasă prin însuși orificiul de injectare.

Alți autori practică, pe lîngă orificiul de injectare, și un orificiu de ieșire, la celălalt pol al oului, pentru albușul deplasat de masa celui injectat, tehnică pe care noi nu o recomandăm. În sfîrșit, alți cercetători injectează albușul străin după scoaterea prealabilă a albușului propriu. Orificiul se închide fie cu parafină, fie cu un fragment de coajă lipit cu ceară, ori parafină (sau clei de făină).

Scoaterea lichidului subembrionar sau injectarea unor substanțe în lichidul subembrionar la oul neferestruit se face ușor în a cincea zi de incubație, transluminînd oul (vezi mai sus „Transluminarea"). Se determină poziția embrionului și a vaselor mari viteline, și se marchează locul de introducere a canulei de injecție, evitînd aceste vase. După ce am perforat cu vîrful unui stilet steril sau cu un extractor dentar de nervi coaja și membrana papiracee la locul însemnat, introducem o pipetă de sticlă de dimensiuni corespunzătoare, perforînd peretele sacului vitelin (evitînd bineînțeles vasele mai mari). Putem aspira imediat, dacă am pătruns corect în spațiul subembrionar, cîțiva mililitri de lichid subembrionar sau putem injecta în această cavitate substanța cu care lucrăm.

Este important ca în timpul intervenției oul să fie așezat în poziția pe care a avut-o în incubator.

O variantă a acestei tehnici constă în denudarea unei mici porțiuni a membranei papiracee prin îndepărtarea unui fragment de coajă, clarificarea membranei cu o picătură de ulei de parafină și executarea puncției spațiului în care dorim să pătrundem sub controlul lupei binoculare, prin membrana papiracee.

În cazul oului ferestruit putem injecta sau puncționa, în scopul scoaterii conținutului, orice spațiu al complexului embrionar. Aici ne servim de pipeta descrisă în subcapitolul „Microinstrumente" și executăm operația sub controlul lupei binoculare. Astfel, putem injecta cu ușurință cavitatea alantoidiană, cavitatea amniotică, cavitatea subembrionară. De pildă, embrionul suportă foarte bine injecții de tuș diluat în spațiul subembrionar începînd cu a doua zi de incubație.

O importanță deosebită o au injecțiile sau scoaterile de lichid din cavitatea celomică extra- și intraembrionară (V. H a m b u r g e r).

După experiența noastră, această cavitate devine mai ușor abordabilă la începutul celei de a treia zile de incubație, cînd cutele amniotice nu s-au împreunat încă deasupra corpului embrionului.

Printr-o ușoară colorație vitală cu un portcolorant de agar (vezi „Colorația vitală") evidențiem cutele amniotice laterale. Înțepînd cu micropipeta una din aceste cute, pătrundem în partea extraembrionară a celomului, situat între cele două foițe — parietală și viscerală — ale mezodermului extraembrionar (între care există în acest moment un spațiu relativ larg, umplut cu lichid). Acest spațiu comunică cu cavitatea celomică intraembrionară (fig. 68).

Începînd cu a treia zi de incubație reușesc mai ușor și injecțiile interstițiale în înseși țesuturile corpului embrionar. Aceste injecții se execută tot cu pipeta descrisă, al cărei vîrf trebuie însă să fie suficient de fin pentru a nu provoca hemoragii mari în embrion, lăsînd totuși să treacă substanța pe care dorim s-o injectăm și cu care am încărcat în prealabil pipeta.

Înțepînd în felul acesta corpul embrionului sub controlul lupei binoculare, putem injecta interstițial mezenchimul, diferitele organe, putem provoca hemoragii interstițiale localizate. De obicei, embrionul supraviețuiește acestor intervenții, dacă nu se produce o hemoragie prea mare.

Deosebit de importantă este posibilitatea de a pătrunde, în felul acesta, în lumina canalului ependimar al măduvei, ceea ce permite injectarea acestui canal în totalitate, pînă înspre cavitățile ventriculare ale creierului. Introducerea unor substanțe în cavitățile ventriculare ale creierului embrionului de 4—5—6 zile de incubație este mult mai ușoară folosind această tehnică decît puncția directă a acestor cavități, înconjurate de un plex vascular foarte bogat, care sîngerează abundent la cel mai mic traumatism.

INJECTAREA VASELOR INTRAEMBRIONARE

Injectarea vaselor intraembrionare ocupă un loc deosebit de important în embriologia experimentală.

Începînd cu a treia zi de incubație vedem cu ușurință, cu ajutorul lupei binoculare, trunchiurile mari arteriale și venoase intraembrionare. Se pot repera astfel venele cardinale anterioare și posterioare, sinusul Cuvier, aorta, arcurile vasculare branhiale etc. Aceste vase pot fi punctate cu vîrful micropipetei. Este bine ca lichidul de injectat să aibă o colorație de contrast, care ne va permite să controlăm reușita injecției și să urmărim substanța injectată, antrenată de curentul sanguin în vasul injectat, fie în direcția inimii, în cazul injectării unei vene, fie spre circulația vitelină sau alantoidiană în cazul puncției unei artere (fig. 67).

Începînd cu a patra zi, și chiar mai devreme, reușește puncția cardiacă (fie în scopul unei injecții intracardiace, fie în scopul prelevării de sînge). Dacă vîrful pipetei este suficient de subțire, această operație se poate face evitînd aproape orice hemoragie. Bineînțeles, începînd cu un anumit calibru al pipetei, aspirația și scoaterea sîngelui aspirat încep să întîmpine dificultăți.

Încercarea de a injecta direct, la oul ferestruit, trunchiurile vasculare mari viteline sau alantoidiene nu reușește decît foarte rar, aceste vase deplasîndu-se cu ușurință în fața

vîrfului pipetei. Pentru a obține o injecție intravenoasă a unui vas alantoidian (tehnică foarte importantă) am adoptat tehnica descrisă de Eichhorn (1940). Iată timpii acestei tehnici. La oul de cel puțin 10 zile de incubație se însemnă cu creionul pe coajă locul unei vene alantoidiene mai groase, reperată prin transluminare. Putem distinge venele de artere prin faptul că arterele sînt mai mobile și pulsează, pe cînd venele, nepulsatile, apar aderente de fața internă a membranei papiracee.

De-a lungul unui asemenea traiect venos, desenat pe lungimea de un centimetru pe suprafața cojii, tăiem cu ajutorul frezei dentare, un orificiu de formă dreptunghiulară (fig. 67), păstrînd cu minuțiozitate intactă membrana papiracee. După ce am ridicat porțiunea de coajă, transluminăm din nou oul și verificăm prezența trunchiului venos ales de noi în partea denudată a papiraceei, pe care o transparentizăm cu o picătură de ulei de parafină. Vasul ales apare acum cu mare claritate, împreună cu afluenții săi, a căror poziție ne permite și cunoașterea direcției curentului sanguin.

Orice vătămare a membranei papiracee este urmată imediat, fie de o hemoragie, fie de pătrunderea de aer între papiracee și corion-alantoidă, care se dezlipește, făcînd imposibilă continuarea operației în acest loc. În cazul cînd am procedat corect, putem trece la executarea injecției propriu-zise, care se face cu pipeta de sticlă încărcată cu substanța de injectat și prevăzută cu un tub de cauciuc pe care fie că îl ținem în gură, fie că îl armăm cu seringa pe care o mînuiește un ajutor.

Cu ochiul liber sau sub controlul lupei binoculare cateterizăm prin membrana papiracee, vena aleasă în direcția axului longitudinal al vasului și a curentului sanguin, injectînd apoi încet substanța, care se poate urmări imediat de-a lungul vasului injectat, dacă este colorată.

ALTE INTERVENȚII

La o serie de cercetări apare necesitatea de a urmări suprafața cutanată dorsală a embrionului, eliberată de membrana amniotică, care o acoperă în mod normal. Urmărim deci obținerea vederii directe și clare a suprafeței embrionului, nestingherită de amnios sau alte părți extraembrionare, după a treia zi de incubație.

În acest caz trebuie să procedăm la „dezamniotizarea" embrionului.

În a treia zi de incubație depunem un portcolorant de agar îmbibat cu roșu neutru sau albastru de Nil, fie pe regiunea cefalică, fie pe regiunea caudală a embrionului (vezi „Colorația vitală"). După ridicarea portcolorantului, cutele amniotice apar colorate. Cu ajutorul instrumentului operator ascuțit (vezi „Instrumente de microchirurgie") incizăm membrana vitelină și apoi cuta amniotică, fie deasupra capului embrionului, fie deasupra trunchiului embrionului, pătrunzînd în acest ultim caz adînc sub breșa amniotică încă deschisă în ziua a treia de incubație.

Dacă deschiderea amniosului este suficient de largă, obținem, în unele cazuri, suprimarea definitivă a închiderii sacului amniotic, embrionul rămînînd neacoperit de această membrană și binețeles fără a putea beneficia de acumularea lichidului amniotic. Dacă, în aceste cazuri, putem profita mai multe zile în șir (de obicei chiar pînă la a 12—13-a zi de incubație) de o vizibilitate perfectă a suprafeței dorsale și laterale a corpului embrionului, acest avantaj se asociază însă cu instalarea unor malformații cauzate de lipsa lichidului amniotic. Embrionul moare, de obicei, în jurul celei de a 15-a zile de incubație.

Este interesant că putem extirpa cu ușurință, la embrionul de 4 zile de incubație, vezicula alantoidiană abia apărută în celomul extraembrionar al regiunii caudale a embrionului. Fără a folosi vreo colorație vitală prealabilă, „încărcăm" pediculul acestei vezicule bogat vascularizate pe acul operator și o smulgem cu o mișcare bruscă. Hemoragia care se produce este relativ neînsemnată și, în majoritatea cazurilor, suportată de embrion. În zilele care urmează putem observa uneori regenerarea unei vezicule alantoidiene, în alte cazuri embrionul rămîne „dezalantoidizat", situație compatibilă cu viața numai pînă la opta zi de incubație, cînd respirația alantoidiană devine indispensabilă.

TEHNICI DE TRANSPLANTARE

O serie de probleme cercetate de noi au necesitat aplicarea metodei de transplantare homo- sau heterospecifică de organe embrionare sau de organe luate de la organisme în faza postnatală (posteclozională). Aceste transplantări s-au executat fie pe (sau în) corpul embrionului de găină, fie pe membrana sa corion-alantoidă, fie pe peretele sacului vitelin.

Pentru a executa transplantări pe corpul embrionului ne folosim de două tehnici : a) *tehnica transplantării celomice* și b) *tehnica transplantării cu ajutorul mieloschizisului sau rombencefaloschizisului.*

Transplantarea celomică (E. W o l f f, H a m b u r g e r, L e v y - M o n t a l c i n i etc.) constă în introducerea implantului în cavitatea celomică extra- sau intraembrionară, unde — fiind în contact cu pereții celomului — implantul este vascularizat de către gazdă. Introducerea implantului în cavitatea celomică a embrionului gazdă o executăm fie la sfîrșitul celei de-a doua zile de incubație (sau la începutul celei de-a treia zile de incubație), fie în a patra zi de incubație. La sfîrșitul celei de-a doua zile de incubație sau în a treia zi de incubație putem deschide (fig. 68) o cută amniotică (laterală), pătrunzînd astfel în cavitatea celomică extraembrionară și de acolo în cea intraembrionară.

Astfel pot fi introduse în celom implante relativ mari.

După colorația vitală (vezi „Colorația vitală") a porțiunii mijlocii a trunchiului embrionului de două zile și jumătate de incubație, apare net marginile cutelor amniotice laterale (fig. 69). Incizia cu acul operator se face în afara marginii de răsfrîngere a acestei cute. Cu îndepărtătorul bont (vezi „Instrumente microchirurgicale") putem ridica lama compusă din ectoderm și mezoderm (somatopleură) și pătrunde în spațiul celomic înspre linia mediană a embrionului pînă în vecinătatea organelor axiale (aorta, coarda).

În a patra zi de incubație, amniosul s-a închis complet și s-a desprins de seroasa lui Baer. În regiunea caudală a corpului embrionului a apărut vezicula alantoidiană ca o evaginație a intestinului caudal, care proemină în celomul extraembrionar. Peretele veziculei alantoidiene nu s-a sudat încă cu seroasa lui Baer (corion), membrana corion-alantoidiană formîndu-se ceva mai tîrziu. Incizînd corionul (seroasa lui Baer) deasupra veziculei alantoidiene (fig. 68) putem pătrunde în celomul extraembrionar și — strecurîndu-ne lîngă alantoidă — în cel intraembrionar.

Majoritatea implantărilor în corpul embrionului le-am executat însă cu ajutorul tehnicii de „mieloschizis" sau „rombencefaloschizis", elaborată de noi în anul 1948, în colaborare cu C. R î m n i c e a n u. Principiul acestei metode constă în redeschiderea — în a treia zi de incubație — a tubului neural recent închis și în depunerea implantului pe jgheabul neural creat astfel din nou. Implantul se află în felul acesta așezat între buzele

inciziei ectodermului tegumentar și pe jgheabul neural. Plaga operatoare însăși menține implantul pe loc (grefă „autoforă"). În aceste condiții, grefele sînt vascularizate și inervate repede de către gazdă.

EXECUTAREA MIELOSCHIZISULUI

Momentul cel mai favorabil pentru executarea acestei operații este în a treia zi de incubație, zi în care trunchiul embrionului nu a suferit încă torsiunea laterală și în care există încă o breșă amniotică (partea neînchisă a amniosului) deasupra părții caudale a corpului embrionar [1]). După ce am ferestruit oul în a doua zi de incubație, în modul descris, verificăm în a treia zi prezența caracterelor morfologice tipice pentru acest moment al dezvoltării ontogenetice, favorabil intervenției noastre (vezi Anexa III). După ce am selecționat embrionii prezentînd momentul optim de dezvoltare, procedăm la colorația vitală, depunînd un portcolorant de agar îmbibat cu roșu neutru sau albastru de Nil pe partea caudală a embrionului (vezi „Colorația vitală"). După ridicarea portcolorantului, breșa amniotică și părțile embrionare subiacente trebuie să fie net colorate. Apare astfel, prin transparența membranei viteline, tubul neural, avînd în dreapta și în stînga bine diferențiate somitele (fig. 39, 40 și 41). Tubul neural și somitele sînt acoperite de ectodermul tegumentar.

Trecem acum la executarea operației propriu-zise de mielo(rahi)schizis.

Primul timp al intervenției constă în incizia cu acul operator ascuțit (vezi „Instrumente microchirurgicale") a membranei viteline situate deasupra tubului neural. Colorația vitală a acestei membrane subțiri și transparente, lipsite de structură celulară, ușurează foarte mult acest timp operator.

Urmează incizia tubului neural (împreună cu incizia ectodermului tegumentar). După incizia membranei viteline, partea caudală a trunchiului embrionului ne apare clar și direct accesibilă prin breșa amniotică. Tubul neural prezintă pe linia mediană o dublă dungă fină, albicioasă, locul sudurii dorsale a ridicăturilor neurale. Sub controlul binocularului aplicăm acul operator cu vîrful său exact pe această dungă, în regiunea neacoperită de amnios.

La o ușoară apăsare, sudura dorsală a tubului neural plesnește și vîrful instrumentului pătrunde în lumina canalului ependimar, fără a străbate însă comisura ventrală, greșeală care este urmată de obicei de o hemoragie mai mult sau mai puțin puternică. Acul operator pătruns în canalul ependimar deschide acum tubul neural pe o lungime care poate varia — după nevoie — de la 5 pînă la 15 segmente (uneori și mult mai mult). Putem pătrunde cu acul operator dedesubtul marginii craniale a breșei amniotice, pînă departe înspre mielencefal (fig. 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78 și 79).

În măsura în care vîrful instrumentului operator deschide sudura dorsală a tubului neural, buzele inciziei se îndepărtează una de cealaltă sub influența unei tracțiuni transversale, grație căreia plaga operatoare creată în tubul neural rămîne deschisă. Această tracțiune transversală se instalează abia în a treia zi de incubație. Ea este în legătură cu diferențierea membrelor, cu migrarea materialului muscular dorsal înspre regiunile ventro-

[1]) Se referă la rasa Leghorn. La Plymouth, amniosul se închide mai încet.

laterale. După părerea noastră, tracțiunea transversală descrisă nu este lipsită de importanță în morfogeneza normală. Vom reveni în capitolele următoare asupra ei.

Dimpotrivă, în primele două zile ale incubației predomină, în corpul embrionului, o tracțiune longitudinală în legătură cu diferențierea axială a somitelor. Această tracțiune longitudinală favorizează închiderea normală a tubului neural.

Dacă intervenția noastră se execută în a doua zi de incubație — deci în timpul existenței tracțiunii longitudinale — tubul neural are tendința să se reînchidă.

Ectodermul tegumentar, incizat și el deasupra tubului neural, se poate dezlipi de pe suportul său mezenchimatos cu instrumentul bont pînă departe — lateral — înspre regiunea mugurilor membrelor. Aceasta permite obținerea de material tegumentar, necesar pentru unele cercetări.

După executarea acestor operații, embrionul gazdă este pregătit să primească implantul.

Pregătirea embrionului donator se face fie de către un ajutor, simultan cu pregătirea embrionului gazdă, fie că implantele sînt pregătite înaintea executării operației de mieloschizis la gazdă. Fragmentele destinate a fi transplantate pot fi pregătite în prealabil și ținute chiar cîteva ore în soluție fiziologică sterilă.

Noi ne folosim de obicei simultan de două dispozitive de observație și operație (fig. 80), așezate pe masa de lucru la o distanță de o jumătate de metru unul față de celălalt. Primul dispozitiv servește pentru pregătirea primitorului, al doilea pentru pregătirea donatorului. Transplantul detașat din donator se introduce imediat în primitor, unde îl așezăm pe suprafața tubului neural redeschis, între marginile de incizie ale tegumentului. Putem acționa asupra implantelor prin diferiți agenți înaintea introducerii acestora în embrionul gazdă.

Cu instrumentul bont ajustăm poziția implantului, asigurîndu-i stabilitatea, acoperindu-l parțial cu marginile secționate ale membranei viteline și ale amniosului.

O variantă a acestei metode constă în folosirea — ca loc de implantare — a regiunii rombencefalului.

Între a doua și a treia zi de incubație putem deschide tavanul subțire al rombencefalului, destins de lichidul ependimar primar (vezi „Intervenții asupra sistemului nervos central”).

Operația se execută după colorația vitală prealabilă a regiunii cefalice a embrionului cu portcolorantul de agar. Se incizează membrana vitelină, seroasa, amniosul (încă strîns în jurul capului embrionului). După aceste incizii ne apare net colorată vezicula otică, cel mai bun reper pentru această operație. Ea ne indică locul inciziei în rombencefal. Implantul este introdus în cavitatea deschisă a veziculei cerebrale. Consecințele acestei operații sînt descrise în capitolul „Intervenții asupra sistemului nervos central”.

Aici, pe lîngă vecinătatea sistemului nervos central, implantul poate fi influențat și de lichidul ependimar primar, care se formează din abundență în interiorul veziculelor cerebrale. Această tehnică a deschiderii rombencefalului constituie, de altfel, primul timp al operației de termocauterizare a pereților rombencefalului (R. Levi-Montalcini) și prin aceasta a originilor reale ale nervilor cranieni pre- și postotici (vezi anexa „Topografia regiunilor operatoare”).

TRANSPLANTAREA PE MEMBRANA CORION-ALANTOIDIANĂ

Inaugurată de Murphy (1912—1916). dezvoltată de Willier (1924), Hoadley (1927), Rudnick (1930), E. Wolff, V. Dantschakoff și mulți alții, metoda a devenit foarte răspîndită și multilateral folosită.

Autorii preconizează, în general, depunerea transplantelor pe membrana corion-alantoidiană de 8—10 zile de incubație, fără a institui o cameră de aer artificială. Se procedează ca pentru injecția intravenoasă corion-alantoidiană (vezi tehnica descrisă mai sus). După ridicarea unei mici parcele de coajă, se depune o picătură de soluție fiziologică pe membrana papiracee și se incizează această membrană „sub apă" (V. Dantschakoff). Implantul se introduce în spațiul dintre papiracee și corion-alantoidă. Orificiul creat în coajă se reînchide, fie cu o lamelă de sticlă, fie cu însăși parcela de coajă ridicată. Acest fel de a proceda exclude însă o observație continuă a implantului. Noi am procedat totdeauna întîi la crearea camerei de aer prin ferestruirea obișnuită în a doua zi de incubație.

Corion-alantoida devine aptă pentru a primi transplante, cu bune condiții de dezvoltare, începînd din a opta zi de incubație, cînd se desăvîrșește structura ei de organ respirator. Începînd din a opta zi de incubație, capilarele respiratoare coriale formează o rețea, pe care noi o descriem în mod amănunțit în subcapitolul „Vascularizația corion-alantoidei". Această rețea are o situație aproape intraepitelială, legătura dintre capilarele și epiteliul ectodermic al corion-alantoidei fiind intimă.

Reactivitatea celulară a membranei corion-alantoidiene este deosebit de mare, mult mai mare decît reactivitatea simultană în corpul embrionului. Motivele acestei inegalități a reactivității celulare în sînul complexului embrionar sînt expuse în capitolul „Dezvoltarea reactivității".

Aceste însușiri, adică vascularizația superficială foarte bogată, marea reactivitate celulară și altele, fac din corion-alantoidă un mediu deosebit de apt pentru a primi transplante. Este important de amintit că, după părerea majorității cercetătorilor, corion-alantoida nu este inervată. Acest fapt permite, prin compararea comportării transplantelor care cresc pe această membrană cu cea a transplantelor pe corpul embrionului, aprecierea efectelor care țin de contactul direct cu terminațiile nervoase existente în corpul embrionului, inexistente în condițiile creșterii pe membrană.

Noi depunem, de obicei, implantele noastre pe membrana corion-alantoidă, după ce am produs în prealabil pe suprafața acestei membrane ușoare sufuziuni sanguine prin frecarea suprafeței cu un instrument de formă adecvată (fig. 81).

După închiderea ferestrei oului, urmărim prin observație directă comportarea implantelor și a membranei corion-alantoidiene ori de cîte ori o dorim. Acest avantaj al observației prin fereastră este însă diminuat de posibilitatea unor infecții (uneori virotice) nedorite, a edemului sau în unele cazuri a uscării membranei.

Implantările reușesc și pe aria vasculară a sacului vitelin și chiar în interiorul acestui sac (fig. 82). Aici putem lucra în epoci precoce de incubație, începînd chiar cu a doua zi. În acest scop, implantul se depune întîi pe membrana vitelină, fie în plină arie vasculară, fie în afara sinusului terminal. Alături de implant incizăm sub controlul lupei binoculare membrana vitelină (eventual după colorația vitală). Lungimea inciziei depășește puțin diametrul cel mai lung al implantului.

Cu instrumentul bont, introducem apoi fragmentul printr-o incizie sub membrana vitelină, unde vine în contact direct cu ectodermul extraembrionar al peretelui sacului

vitelin. Putem pregăti un pat receptor și în acest perete foarte subțire. Este important ca acesta să nu se perforeze, ceea ce duce de obicei la pierderea în profunzime a implantului.

Unii autori caută însă tocmai acest efect, preconizînd cultura implantelor în interiorul sacului vitelin.

Din punct de vedere metodologic, transplantarea pe sau în sacul vitelin, descrisă mai înainte, face legătura cu tehnica *„culturii în ou"*, pe care noi o folosim printre altele ca fază intermediară pentru menținerea în viață a unor organe embrionare înainte de a fi transplantate pe corpul unei gazde embrionare.

La un ou de 2 zile de incubație, ferestruit, excizăm embrionul împreună cu aria sa pelucidă, lăsînd pe loc aria opacă. După îndepărtarea plăcii embrionare, rămîn deci pe loc membranele extraembrionare ale ariei opace (ecto-mezo-endodermul extraembrionar cu insulele sanguine), iar în centru se află golul care lasă să se vadă lichidul subembrionar, existent în acest moment al intervenției. Implantul ia locul embrionului excizat, venind în contact pe margini, cu membranele extraembrionare și se scaldă în lichidul cavității subembrionare. Fereastra se închide și oul se repune în incubator. În caz de reușită se poate observa — după o colorație vitală — cum implantul, crescînd, s-a sudat cu membranele extraembrionare înconjurătoare.

Această tehnică de cultură de țesut (sau de organ) folosește deci ca mediu elementele constitutive ale oului întreg și ale unei părți a plăcii embrionare. Implantul poate asimila astfel, în mare măsură, substanțe specifice rasei sau speciei oului folosit.

Putem cultiva țesuturi sau organe și în *cavitatea sacului amniotic viu*. Aici mediul de cultură se reînnoiește continuu, primind substanțe eliminate la nivelul rețelei vasculare tegumentare ale embrionului.

Lucrăm cu embrioni de cel puțin 3 zile de incubație, prezentînd încă „breșă" amniotică pe cale de închidere. Implantul este introdus, fie prin această breșă — eventual lărgită —, fie prin orificiul pe care îl deschidem în sacul amniotic (în cazul cînd breșa este închisă). Acest orificiu artificial se reînchide spontan. În zilele care urmează se acumulează lichidul amniotic, în care implantul poate fi observat, plutind liber.

EXPLANTAREA ȚESUTURILOR SAU ORGANELOR

Cultura de țesut sau de organe în afara oului, în medii artificiale sau „naturale", constituie o metodă indispensabilă pentru multe cercetări în embriologia experimentală.

Tehnica culturilor de țesut este amplu expusă în tratate speciale, dintre care recomandăm pe cel al profesorului E. C. Crăciun, ceea ce ne dispensează să insistăm aici în mod deosebit asupra ei.

În lucrările noastre ne-am servit mai ales de medii compuse din plasmă heparinată și extract embrionar în picătură suspendată. În unele cazuri am folosit ca mediu de cultură lichidul subembrionar extras din ou între a patra și a șasea zi de incubație. Metoda prelevării acestui lichid a fost descrisă anterior.

Pentru observația vitală continuă a culturilor în picătură suspendată ne servim de un microtermostat special (fig. 45) care permite menținerea lamei, pe care se află cultura, la o temperatură de 38° și în același timp observația ei microscopică.

Atașînd camera fotografică cu oglinda de reflexie la tubul microscopului, putem lua microfotografii seriate ale elementelor cultivate și îndeosebi ale evoluției unuia și aceluiași element din cultură de-a lungul unui număr mai mare de ore.

Culturile de țesut pot fi micromanipulate în cazul cînd dorim să acționăm direct asupra celulelor (constituenților celulari) sau a formațiunilor extracelulare (fig. 83, 84 și 85).

Recomandăm în mod special monografia lui P. Fonbrune acelora care doresc să se inițieze în tehnica micromanipulării. Noi ne servim de camera de ulei indicată de P. Fonbrune (fig. 86). Lamela pe care se află cultura de țesut în mediul ei se detașează de lama scobită pe care a fost montată și se depune (fig. 87) pe camera de ulei. Fără pericol de uscare, elementele culturii pot fi micromanipulate astfel cu ajutorul acelor pregătite în mod special, după tehnica indicată de Fonbrune, pe care o redăm pe scurt aici.

Pe brațul drept al micromanipulatorului se montează un tub de sticlă capilar (preferabil plin, fără lumen). Pe brațul stîng al micromanipulatorului este fixat termocauterul cu ansă de platină, alimentat de o rezistență variabilă. Sub controlul microscopului montat pe micromanipulator, atingem ansa de platină cu vîrful acului de sticlă. Încălzind acum ansa de platină pînă la roșu, se produce topirea vîrfului acului de sticlă. Îndepărtînd printr-o mișcare bine dozată ansa de platină, „extragem" din vîrful de sticlă un filament de sticlă ultrafin, „citologic", a cărui formă și dimensiuni depind de gradul de încălzire a ansei de platină și de mișcarea pe care i-am imprimat-o.

O altă tehnică, pentru obținerea unor vîrfuri sau unor micropipete, constă în încălzirea laterală a tubului de sticlă capilar, în timp ce o greutate exercită o tracțiune dozată asupra tubului. Toate tehnicile de micromanipulare necesită însă, pentru a da rezultate bune, o deprindere obținută printr-un exercițiu îndelungat.

Pentru toate cercetările noastre, fotografia este un auxiliar indispensabil, folosit la fiecare pas, pentru a obține documentarea științifică a fazelor de lucru și a rezultatelor obținute. O parte integrantă a laboratorului de embriologie experimentală este deci atelierul fotografic. Ne folosim, în timpul observațiilor microscopice, de camera fotografică cu oglindă de reflexie adaptabilă la tubul microscopului (fig. 88), iar pentru fotografierea embrionilor vii, de dispozitivul din figura 89.

Tehnicile descrise pînă acum nu epuizează nici pe departe vasta literatură existentă în acest domeniu. Ele se dezvoltă zilnic și fiecare laborator își creează tradiția sa tehnică proprie.

Am descris, cum s-a spus la început, tehnicile de care ne-am servit în lucrările noastre, lucrări a căror expunere va face obiectul capitolelor următoare.

Tehnicile care țin de metoda observației vitale și de metoda intervențiilor directe, despre care a fost vorba în acest capitol, se adresează structurilor din domeniul micro-macroscopic și microscopic.

S-au dezvoltat în embriologia experimentală, strîns legate de metodele biochimice, metode și tehnici prin care se pătrunde însă pînă în domeniul ultrastructural. A luat naștere o „embriologie chimică" (J. Brachet, J. Needham, Dorfmann, V. Mîrza etc.). O deosebită importanță a căpătat studiul dezvoltării și rolului enzimelor în ontogeneză (vezi anexa „Metode histochimice").

Cromatografia și electroforeza au devenit metode deosebit de utile, care permit alcătuirea unui inventar al constituenților de bază (protide, lipide sau glucide) ai organelor și țesuturilor embrionului de-a lungul dezvoltării sale.

Electroforeza este un mijloc de separare îndeosebi a compușilor macromoleculari, în special ai protidelor, glucoprotidelor și lipoprotidelor. Cea mai rapidă tehnică electroforetică este microelectroforeza, cu înregistrare interferometrică. În laboratorul nostru ne-am folosit de electroforeza pe hîrtie, care necesită o aparatură mult mai simplă, dînd

totuşi rezultate mulţumitoare. Unul din avantajele acestei tehnici constă în faptul că ea necesită material biologic pentru analiză în cantitate foarte redusă (0,01—0,1 ml).

Iată, pe scurt, principiul metodei : pe o bandă de hîrtie de filtru îmbibată cu o soluţie tampon se depune lichidul de analizat, conţinînd amestecul de compuşi macromoleculari. La capetele hîrtiei, care sînt în contact cu aceeaşi soluţie tampon, se aplică o tensiune de 100—300 volţi stabilizaţi. În cursul a circa 10—20 de ore, sub acţiunea acestei diferenţe de potenţial, componenţii migrează cu viteze diferite, separîndu-se. Fracţiunile separate se evidenţiază printr-o developare adecvată, apărînd în formă de benzi colorate de intensitate diferită. După felul developării se obţin protido- lipido- şi glucogramele.

Mişcînd banda („elfograma") în faţa unei fante şi înregistrînd intensităţile de lumină prin sisteme fotoelectrice, se poate obţine o curbă care permite o evaluare cantitativă (fig. 90).

Cromatografia permite, mai cu seamă, studiul direct al compuşilor micromoleculari sau, după o hidroliză prealabilă, a celor macromoleculari.

În embriologia experimentală, tehnica cea mai avantajoasă este cromatografia pe hîrtie, fiindcă ea necesită cele mai mici cantităţi de analizat (circa 0,01—5 ml). O picătură de substanţă de analizat, aplicată într-un punct situat marginal pe o hîrtie de filtru, este antrenată de un curent lent de solvent, realizat prin îmbibarea treptată, datorită capilarităţii hîrtiei. După ce aproape toată hîrtia este îmbibată (ceea ce durează de la 10 la 24 de ore) se ajunge la o repartiţie inegală a diferitelor componente. După uscare şi developare, se obţin pete colorate, reprezentînd cîte o componentă din amestecul supus analizei.

Cel mai însemnat avantaj al cromatografiei constă în posibilitatea de a separa compuşi cu structuri foarte asemănătoare, inseparabile pe altă cale în cantităţi atît de mici. Cea mai bună separare se obţine cu ajutorul cromatografiei bidimensionale — cu doi solvenţi diferiţi — acţionînd consecutiv în direcţii perpendiculare (fig. 91). Cromatografia pe hîrtie necesită o aparatură simplă; pentru a obţine însă rezultate comparabile, este nevoie de menţinerea strict constantă a temperaturii. Atît electroforeza, cît şi cromatografia se pot folosi în embriologia experimentală pentru urmărirea evoluţiei biochimice în ontogeneză.

Analiza respiraţiei cu ajutorul aparaturii Warburg sau a altor tehnici (microludioane) şi studiul schimbului de gaze al oului întreg aduc indicaţii preţioase la cercetarea proceselor metabolice şi biochimice. Prof. P. B. T o k i n face în excelenta sa lucrare „Imunitatea la embrion" (1955) o amplă trecere în revistă a principiilor „embriologiei imunologice". Problema reacţiilor imunologice de tip antigen-anticorp în procesul de dezvoltare a embrionului constituie obiectul cercetărilor unui important număr de autori, ca N. I. J u k o v - V e r e j n i k o v, O. E. V i a z o v (1952), G. V. L o p a ş o v şi V. S t r o e v a (1950), P. W e i s s, T a y l o r etc.

Astfel, de relativ scurt timp se dezvoltă, în embriologia experimentală, o metodă nouă, embriologia imunologică. Principiul acestei metode de cercetare constă, printre altele, în prepararea antiserului specific împotriva unui organ sau ţesut (antigenul) al organismului adult şi în căutarea apariţiei acestui antigen la embrion, observînd efectul introducerii antiserului în complexul embrionar, în diferite stadii de dezvoltare.

În sfîrşit, folosirea izotopilor radioactivi promite a deveni o metodă fructuoasă pentru studiul schimbului dintre embrion şi substanţele embriotrofice, pentru studiul

general al relațiilor reciproce din complexul embrionar în condiții normale sau experimentale. Analiza interrelațiilor dintre grefă și gazdă, a difuziunii de substanțe capabile să influențeze „partenerii" va beneficia îndeosebi de această metodă promițătoare.

Sperăm că această metoda importantă va putea fi folosită în curînd și la noi.

BIBLIOGRAFIE

1. Andjaparidze O. P., *Kultivirovanie virusov vescnie- letnego i iaponskogo ențefalita v razvivaiușcemsa kurinom embrione*, J. mikrob., epidemiol. i immunol., 1955, nr. 7, p. 64.
2. Beguelin, *Mémoire sur l'art de couver les œufs ouverts*, Hist. de l'Ac. Roy. des Sciences et Bull. Lettr. de Berlin, t. V, 1751.
3. Benoit I., *Destruction des gonocytes primaires, dans le blastoderme du poulet, par les rayons ultra-violets, aux premiers stades du développement embryonnaire*, în *II Intern. Congr. Sex. Researches*, Londra, 1930, p. 162.
4. Bisceglie V., Juhász A. u. Schaffer, *Die Gewebezüchtung in vitro*. Berlin, Springer, 1928.
5. Bogoliubski S. I. și Mastaler G. A. *Vlianie ciujerodnogo iaiținogo belka na razvitie ptiții* D.A.N. SSSR, 1950, vol. LXXI, nr. 3, p. 549–552.
6. Burnet F. M., *The Use of the Developing Egg in Virus Research*, Med. Reas. Counc. Spec. Rep. Serv. London, nr. 220, 1936.
7. Clark E. R., *Technique of Operation, on Chick Embryos*, Science, 1920, t. 51, p. 371.
8. Crăciun E. C., *La culture des tissus en Biologie expérimentale*, Paris, Masson, 1931.
9. Crișan C., Mihalca I. și Onea D., *Hibridare vegetativă interrasiată și heterostadiată între rasele de găini Leghorn și Rhode-Island*, Bul. științ. Acad. R.P.R., Secțiunea de științe medicale, 1951, t. VI, nr. 4, p. 1085.
10. Dantschakoff W., *Determination in der Keimscheibe des Hühnchens. 1. Der Hensensche Knoten. Untersuchung mittels Radiumemanation*, Arch. f. Entw. mech., t. 127, 1933, p. 542.
11. — *Der Aufbau des Geschlechtes, beim höhren Wierbeltier*, Jena, G. Fischer, 1941.
12. Dantschakoff W. u. Bereskina L., *Keimzelle und Gonade*, Ztschr. f. Zellf., t. 14, 1951, p. 323.
13. Dareste C., *Recherches sur la production artificielle des montruosités ou essais de tératogénie expérimentale*, Paris. 1891.
14. Eichhorn E. A., *Technique for Intravenous Inoculation for Chick Embryos*, Science, 1940, t. 92, p. 245.
15. Ferdinandov V. V., *Iziskanie metodov vegetativnoi ghibridizații jivotnih*, Usp. sovrem. biol., 1952, t. 34, nr. 2–5, p. 307.
16. Féré Ch., *Remarques sur l'incubation des œufs de poule privés de leur coquille*, C.R. Soc. biol., 1900, t. 52, p. 601.
17. Fonbrune P., *Metodi mikromanipulații*, Moscova, Izd. Inostr, Zit., 1951.
18. Frey-Wyssling A., *Submikroskopische Morphologie des Protoplasmas und seiner Derivate*, Protoplasma Monographien, t. XV, Berlin, Bornträger, 1938.
19. Gerlach L., *Über die Bebrütung von Vogeleiern nach Laesion der Eischale*, Sitzungsber. d. physik. Medizin Societät zu Erlangen, 1884, t. 16, p. 129.
20. Goodpasture E. W., *Some Uses of the Chick Embryo for the Study of Infection and Immunity*, Am. J. Hyg., 1938, nr. 28, p. 111.
21. Goodpasture E. W., Woodruff A. M. a. Buddingh G. J., *Vaccinal Infection of the Chorioallantoic Membrane of the Chick Embryo*, Am. J. Pathol,. 1932, nr. 8, p. 271.
22. Gräper L., *Beobachtungen von Wachstumerscheinungen an Reihenaufnahmen lebender Hühnerembryonen nebst Bemerkungen über vitale Färbung*, Arch. f. Entw. Mech., 1911, t. 33, p. 303.
23. — *Die Primitiventwicklung des Hühnchens nach stereokinematographischen Untersuchungen, kontrolliert, durch vitale Farbmarkierung*, Arch. f. Entw. Mech., 1929, t. 116, p. 382.
24. Grossfeld I., *Handbuch der Eierkunde*, Berlin, Springer, 1938.
25. Hamburger V., *Experimentelle Beiträge zur Entwicklunssphysiologie der Nervenbahnen i. v.*, Roux' Arch. f. Entwmech., 1928, nr. 114, p. 272.
26. Hașek M., *Vegetationi hibridizace u zivocihu*, Praga Cesk. Acad. Ved., 1953.

27. H o a d l e y L., *Concerning the Organization of Potential Areas in the Chick Blastoderm* J. of. Exp. Zool., 1927, t. 48, p. 159.
28. K o l o b o v G. M. i I a i ț i n i n N. N., *Ptițevodstvo v kolhozah*, Moscova, Selhozghiz, 1952.
29. K o p s c h F., *Primitivstreifen u. organbildende Keimbezirke beim Hühnchen untersucht mittels elektrolytischer Marken am vital gefärbten Keim*, Ztschr. f. anat. Forsch., 1927, t. 8, p. 512.
30. L a c a s s a g n e A. et D e s c l i n L., *Sur l'emploi des rayons et du Polonium en embryologie comme agents de destructions localisées*, C. R. Soc. biol., 1928, t. 98, p. 98.
31. L e p e ș i n s k a i a O. B., *Novie dannie po probleme rezvitiia kletocinih i nekletocinih form jivogo veșcestva*, Moscova, 1954.
32. L i l l i e Fr. R., *Experimental Studies on the Development of the Organs in the Embryo of Fowl. Experiments on the Amnion and the Production of the Anamniete Embryo of the Chick*, Biol. Bull., 1903, t. 5, p. 92.
33. M a k a r o v P. V., *Osnovi titologhii*, Sov. Nauki, 1953.
34. M a u c h A., *Creșterea păsărilor*, București, Ed. agro-silvică de stat, 1953.
35. M e n k e s B., *Conceptul lărgit al morfologiei și dialectica formei*, Studii, 1948, nr. 2, p. 50.
36. M e n k e s B. și B r ă t i a n u - R i m n i c e a n u C., *Cercetări experimentale asupra rahiomieloschisisului*, Bul. științ. Acad. R.P.R., Seria științe medicale, 1950, t. II, nr. 9, p. 1093.
37. M e n k e s B. și R î m n i c e a n u C., *Intervenții microchirurgicale asupra sistemului nervos central la embrionul de găină. I. Distrugerea veziculelor cerebrale și ale cupei optice. Tehnica intervențiilor și rezultatele obținute.* Bul. științ. Acad. R.P.R., Secțiunea de științe medicale, 1953, t. V, nr. 2, p. 237.
38. M e n k e s B., R î m n i c e a n u C. și M i c l e a C., *Contribuții la tehnica microintervențiilor asupra sistemului nervos central la embrionul de găină*, Studii și cercetări științ. Acad. R.P.R., Baza Timișoara, 1953, an. I, nr. 1—4, p. 439.
39. M i c i u r i n I. V., *Opere alese*, Ed. Acad. R.P.R., 1954.
40. M i l c u Șt., *Stimularea dezvoltării și ovogenezei cu iodoproteină*, Studii și cercetări de endocrinol., 1954, t. V, nr. 3—4, p. 405.
41. M î r z a V. D., S z é k e l y C. și K o v a c s V. V., *Influența factorilor externi asupra dezvoltării embrionului de găină*, Studii și cercetări științ. Acad. R.P.R., Filiala Cluj, 1955, an. VI, nr. 3—4, p. 127.
42. M u r p h y I. B., *Transplantibility of Tissues to the Embryo of Foreign Species*, J. of. exp. Med., 1913, t. 17, p. 482.
43. P a r h o n C. I., P i l i ș M., D î n t o ș i n M., I a n c u L., R a d u C. și S i m i n o l N., *Modificările ponderale și ale structurii glandelor endocrine la produșii scroafelor tratate cu cazeină iodată în perioada de gestație și lactație*, Studii și cercetări de endocrinol., 1954, t. V, nr. 1—2, p. 93.
44. P a v l o v I. P., *Opere alese*, ed. a 2-a, Ed. Acad. R.P.R., 1952.
45. P e n j o n k i e v i c i E. E., *Creșterea păsărilor*, Ed. de stat, 1951.
46. R i v e r s T., *Virusnik i rikketsiosnik infekții celoveka*, Moscova, 1955.
47. R o s k i n G. I., *Mikroskopiceskaia tehnika*, Izd. Sov. Nauk, Moscova, 1951.
48. R u d n i c k D. a. R a w l e s M. E., *Differentiation of the Gut from Chick Blastoderms in Chorioallantoid Grafts*, Physiol. Zool., 10, p. 381.
49. S a b e l e v I. K., P e n i o n k e v i c i E. E., G r i g o r i e v G. K., *Polevoe soderjanie selskohoziaistvennoi ptiți*, Moscova Selhozghiz, 1951.
50. S c h w a l b e E., *Die Morphologie der Missbildungen des Menschen und der Tiere*, 1913, Jena, G. Fischer.
51. S c y m k i e w i c z, *Beitrag zur Lehre von den künstlichen Missbildungen am Hühnerei*, Wiener Sitz. Ber. d. Naturw., 1875, t. 72, p. 139.
52. S o p i k o v P. M., *Bolesni ptiț*, Selhozghiz, 1953.
53. S p r a t t W. T. Jr., *Analysis of the Organizer Center in the Early Chick Embryo*, J. of Exper. Zool., 1955, vol. 128, nr. 1, p. 121.
54. S z e p s e n w o h l I., *Un nouveau procédé tératogène approprié à la production certaine des omphalocéphales chez les embryons de poulets*, C. R. Soc. biol., 1933, t. III, p. 950.
55. T c h a c h o t i n S., *Die mikroskopische Strahlenstichmethode, eine Zelloperationsmethode*, Biol. Zentralbl., 1912, t. 32, p. 623.
56. T e b i a k i n a A. E., *Kurinii embrion kak model dlia oțenki lecebnogo deistviia antibiotikov pri eksperimentalnoi holere*, J. mikrobiol., epidemiol. i immunol., 1955, nr. 7, p. 25.
57. T r e t i a k o v N. P., *Inkubațiia iaiț selkohoziaistvenih ptiț*, Moscova Selhozghiz, 1951.
58. — *Inkubațiia*, Moscova, Izd. solh. lit., 1953.
59. *** *Trudi Naucino-issledovatelskogo instituta ptițevodstva*, t. XXII, Moscova Selhozghiz, 1952.

60. Vogt W., *Gestaltungsanalyse und Mesodermbildung bei Urodelen u. Anuren*, Roux'Archiv. Entw., 1929, vol. 120, p. 385.
61. Volmer H., *Eine Methode zur Beobachtung der Entwicklung des Hühnerembryos in vitro*, Zschr. f. Zellf. u. mikr. Anat., 1935, vol. 33, nr. 3, p. 50.
62. Waddington C. H., *Experiments on the Development of Chick and duck Embryos, cultivated in vitro*, Philos. Trans. Roy. Soc. London, Ser. B, vol. 221, 1932, p. 179—180.
63. Warynski St. et Fol H., *Recherches expérimentales sur le mode de formation des omphalocéphales*, Rec. Zool. Suisse, 1884, t. 1, p. 291.
64. Willier B. H., *The Endocrine Glands and the Development of the Chick. 1. The Effects of Thyroid Grafts* *Amer. Journ. Anat.*, 1924, t. 33, p. 67.
65. Wol B. K., *Patologoanatomiceskoe vskritie selskohozaistvennih jivotnih*, 1953.
66. Wolff E., *Les bases de la tératogénèse expérimentale des vertébrés amniotes d'après les résultats des méthodes directes*, Strassburg, Ed. Union, 1936.
67. Zeiger K., *Physikochemische Grundlagen der histologischen Methodik*, 1938, Th. Steinkopff.



Fig. 6. — Aspecte din crescătoria de păsări.



Fig. 7. — Căsuța cu cuiburi capcană

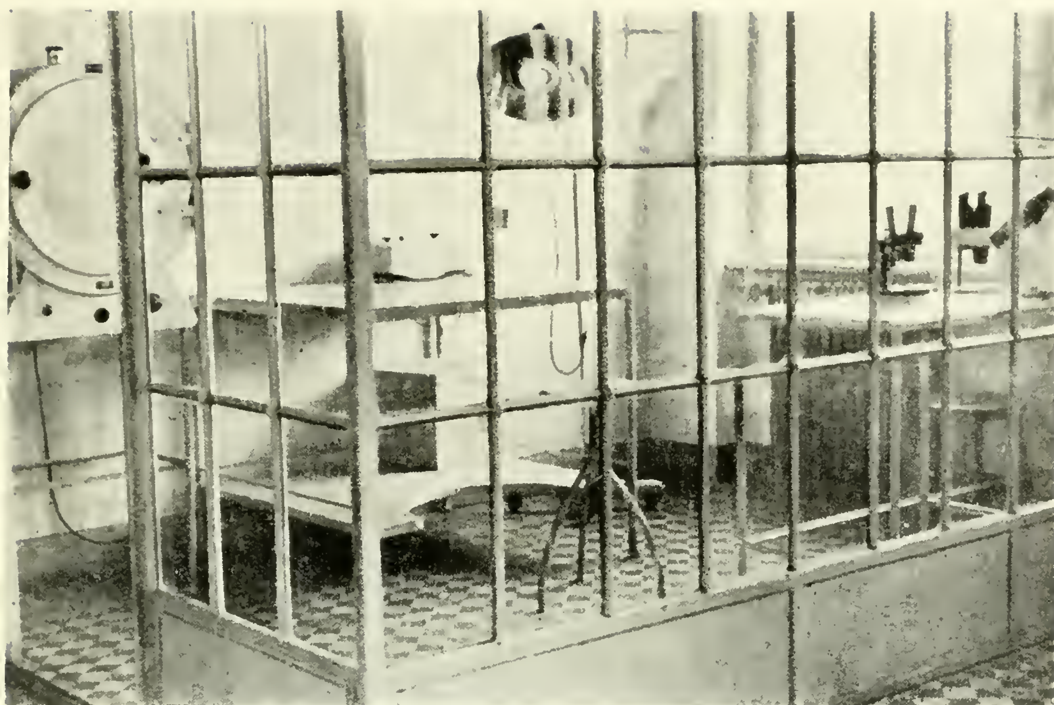


Fig. 8. — O boxă de lucru în laboratorul de embriologie experimentală.

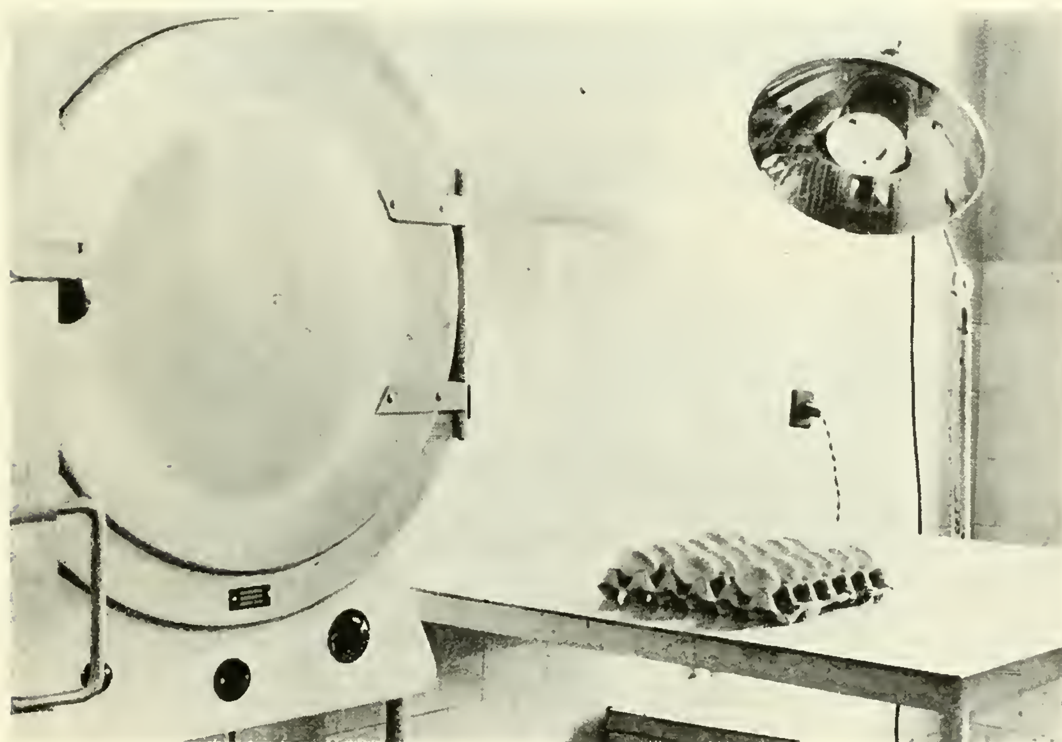


Fig. 9. — Masa de lucru pentru ferestruirea ouălor.

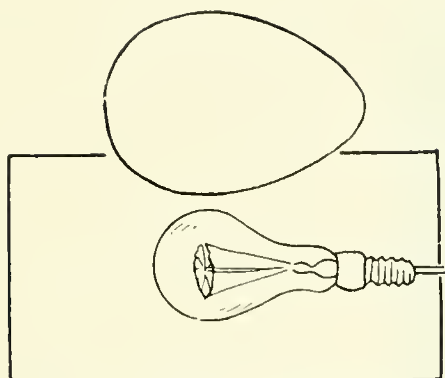


Fig. 10. — Schema ovoscopului simplu.

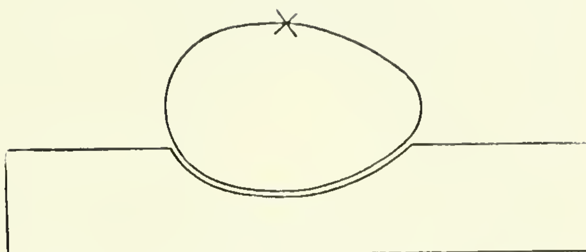


Fig. 11.— Așezarea oului pentru a fi ferestruit. x — punctul culminant avut în termostat.



Fig. 12. — Oul este așezat pe suportul său, avînd semnul „punctului culminant" pe coajă. Cu stiletul se practică un orificiu punctiform în apropierea polului ascuțit.

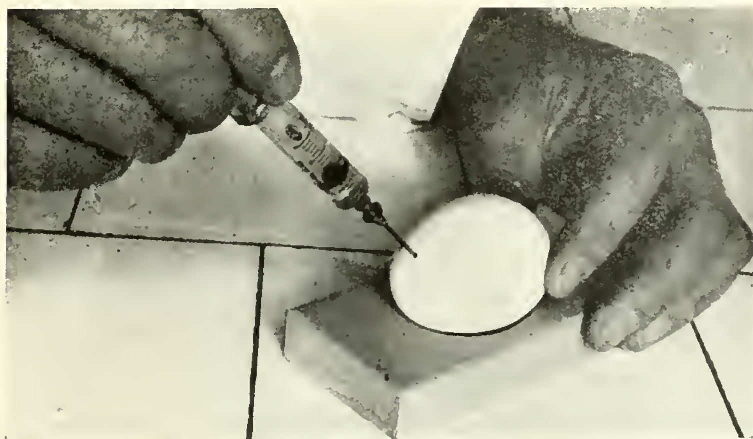


Fig. 13. — Se extrage cu seringa 1 ml albuș.

Fig. 14. — Orificiul se închide cu ceară.



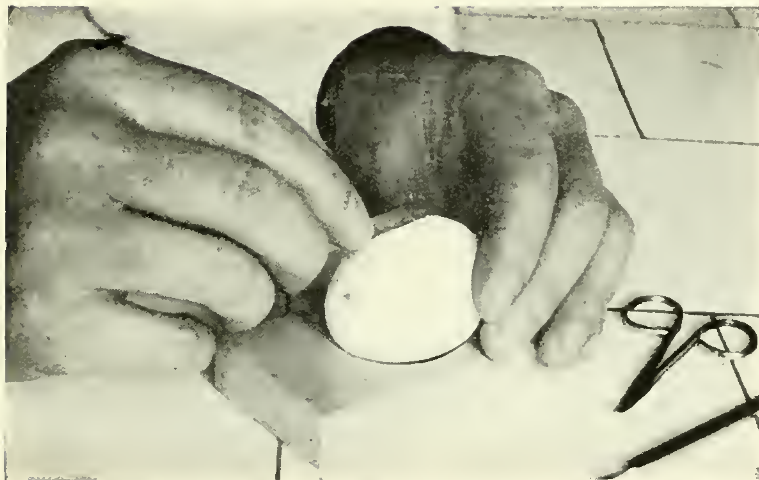


Fig. 15 — Se excizează cu pila un pătrat de coajă.

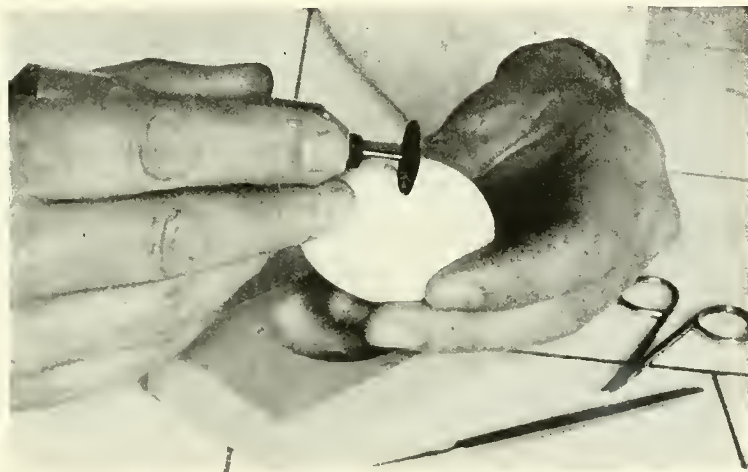


Fig. 16. — Aceeaşi operaţie executată cu freza dentară.

Fig. 17. — Se îndepărtează pătratul de coajă, lăsînd papiraceea intactă.



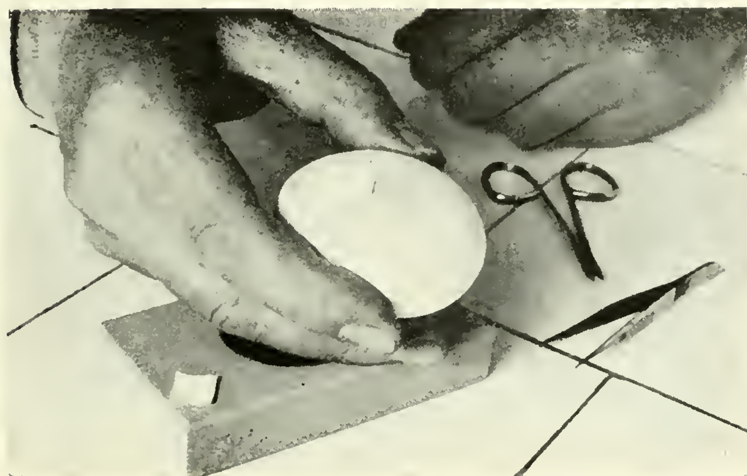


Fig. 18. — Membrana papiracee denudată.

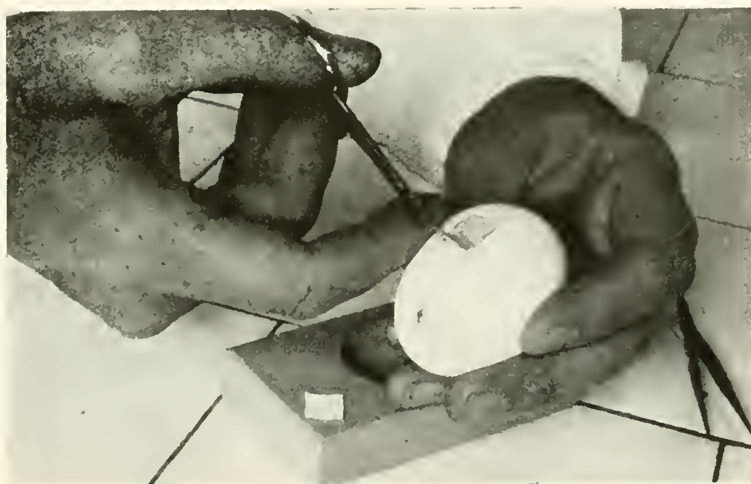


Fig. 19. — Incizia membranei papiracee.

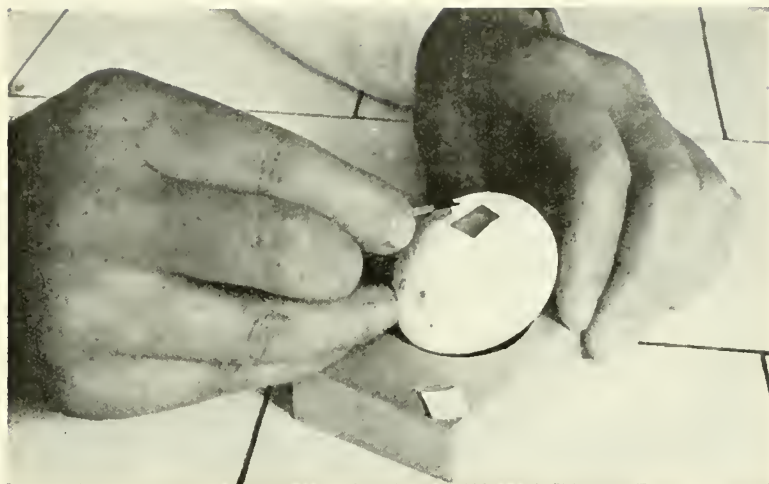


Fig. 20. — Îndepărtarea membranei papiracee.

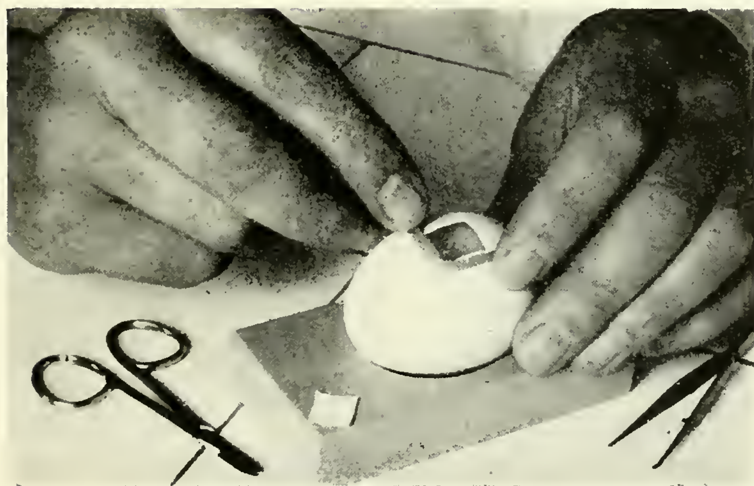


Fig. 21. — Depunerea unei rame de parafină — ceară de jur împrejurul orificiului tăiat în coajă.

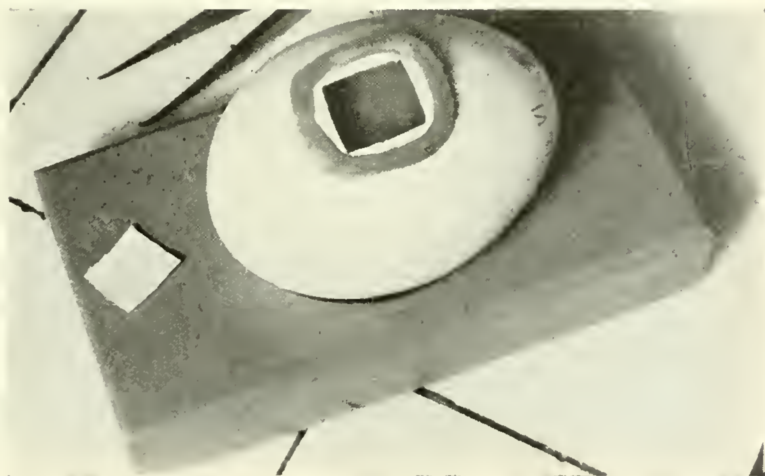


Fig. 22. — Aceeași explicație ca în figura 21.

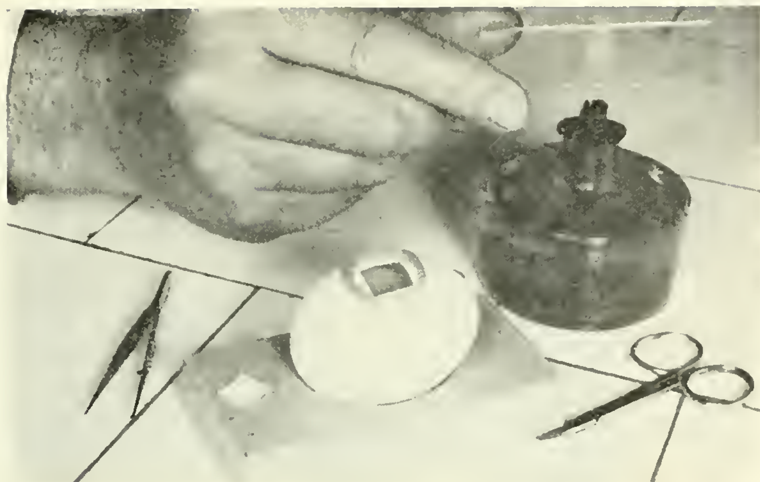


Fig. 23. — Închiderea orificiului printr-o lamă încălzită.

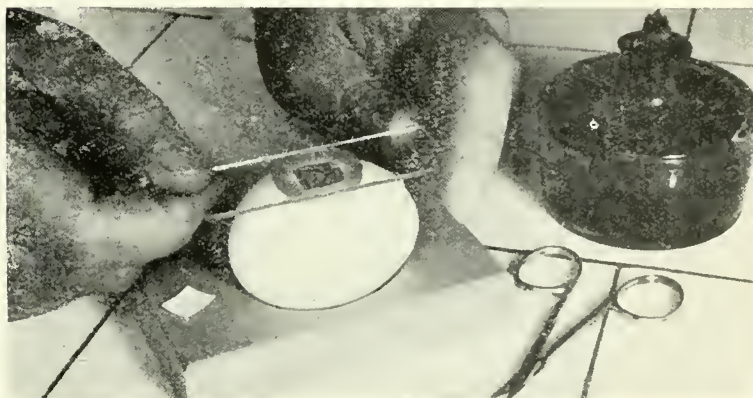


Fig. 24. — Oul ferestruit a fost închis.

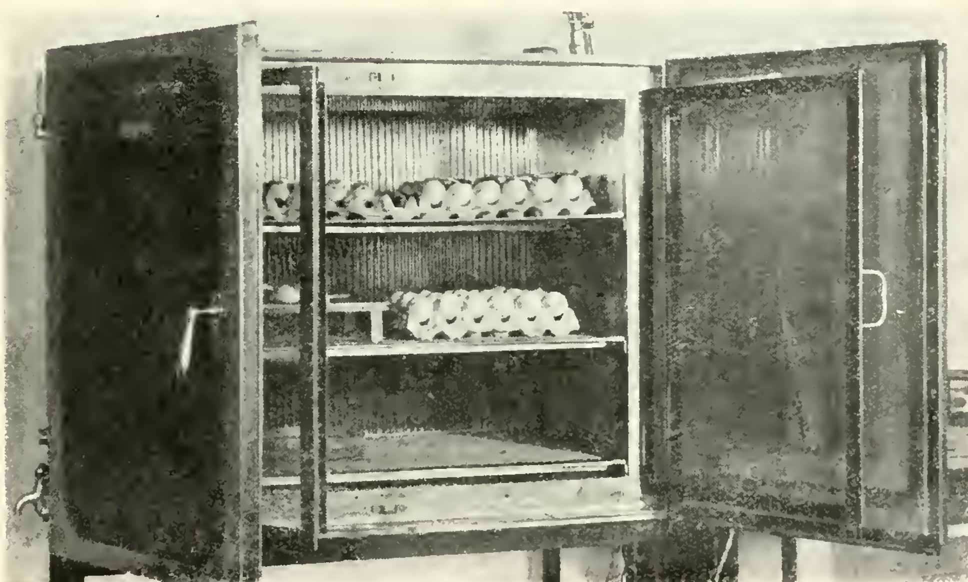


Fig. 25. — Așezarea ouălor ferestruite în incubator.



Fig. 26. — Dispozitivul de observaţie şi operaţie.

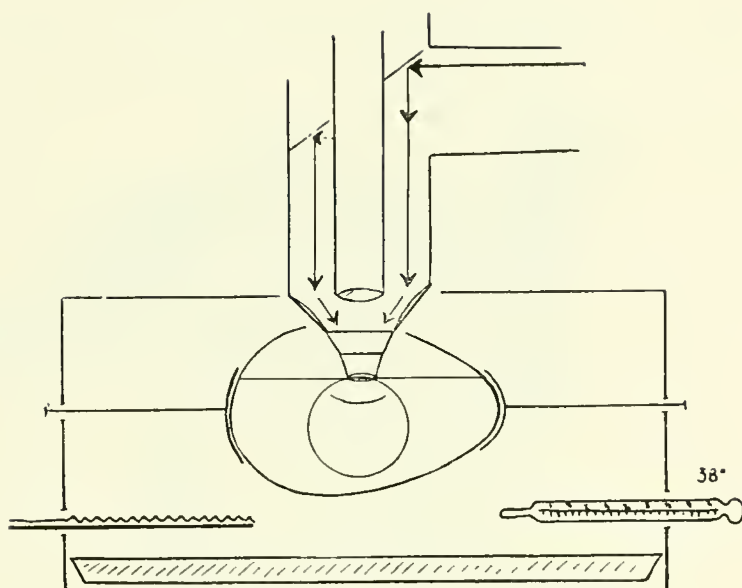


Fig. 27. — Schema microtermostatului de ou și a microscopului ultropac.

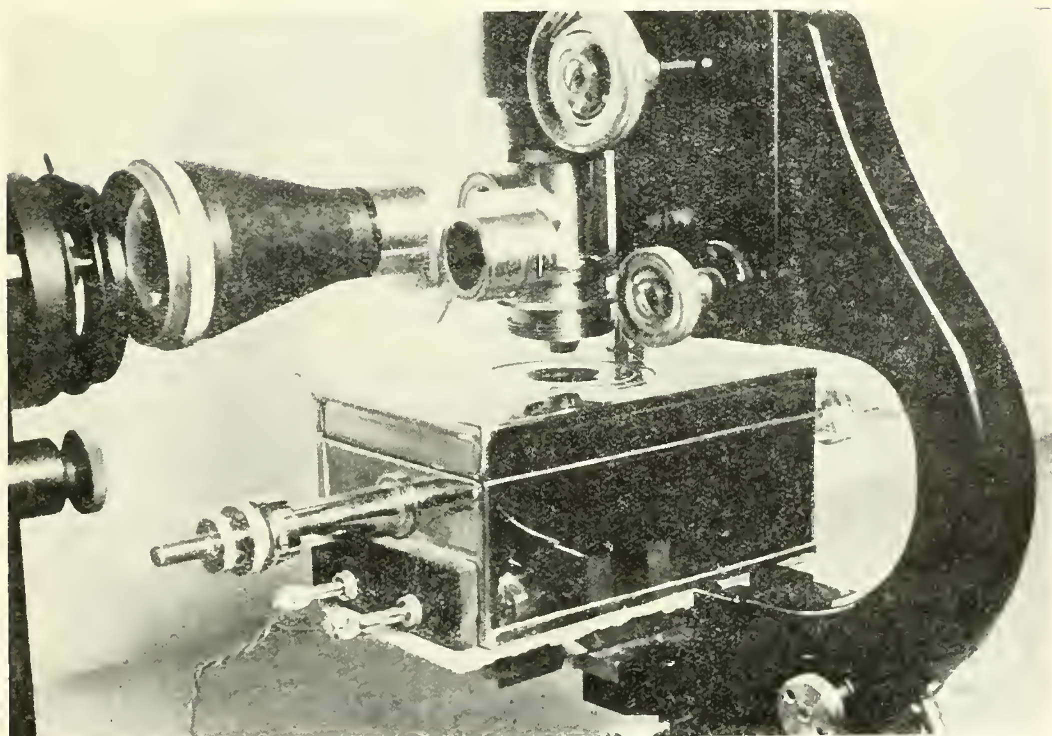


Fig. 28. — Microscopul ultropac și termostatul de ou.

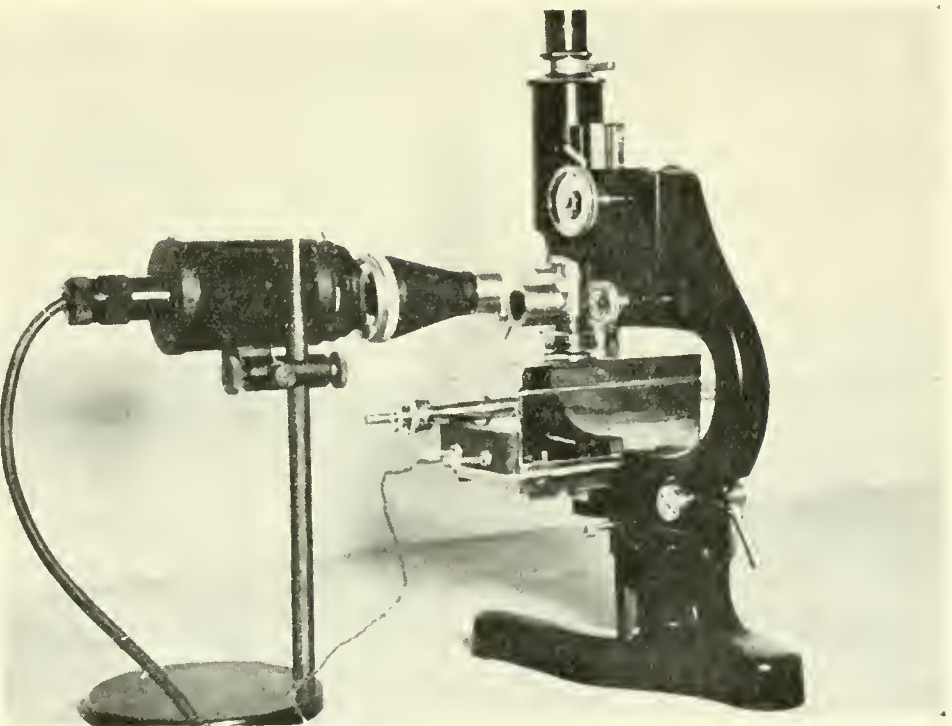
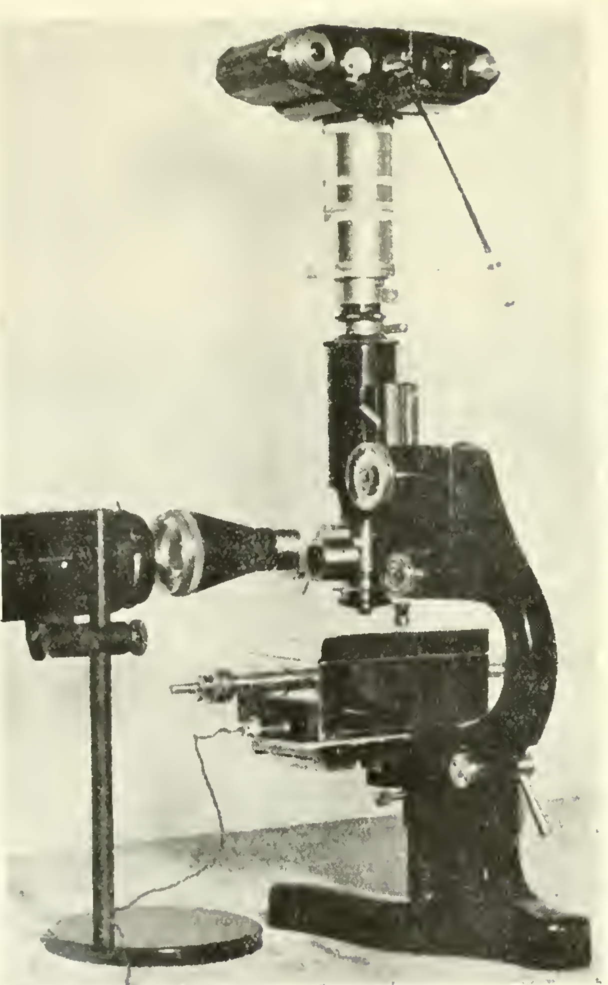
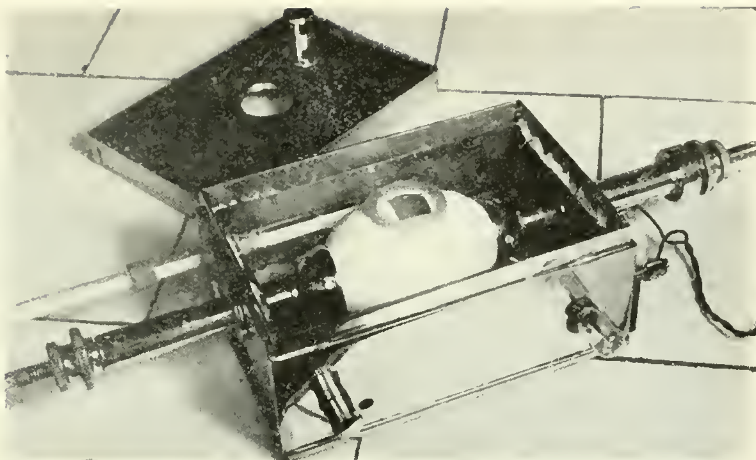


Fig. 30. — Modul de observaţie a embrionului viu cu ajutorul microscopului ultropac şi al termostatului de ou.



← Fig. 29. — Microscopul ultropac cu dispozitivul fotografic şi microtermostatul de ou.

Fig. 31. — Interiorul microtermostatului de ou.



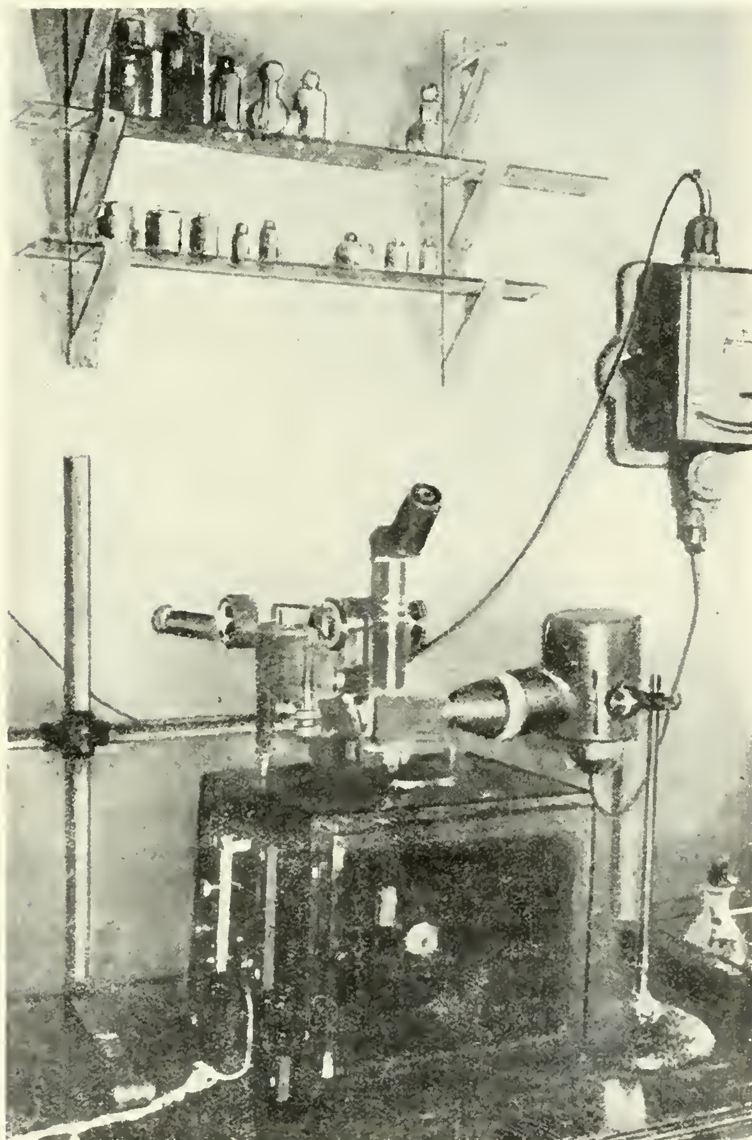


Fig. 32. — Dispozitivul lui O. B. Lepeşinskaia pentru observaţia embrionului viu cu microscopul ultropac. (Din O. B. Lepeşinskaia, *Originea celulelor din substanţa vie*, Ed. Acad. R.P.R.).





Fig. 33. — Dispozitivul Lepşinskaia - Lapisova pentru observaţia vitală a suprafeţei plăcii embrionare. (Din O. B. L e p e ş i n s k a i a, *Originea celulelor din substanţa vie*, Ed. Acad. R.P.R.).

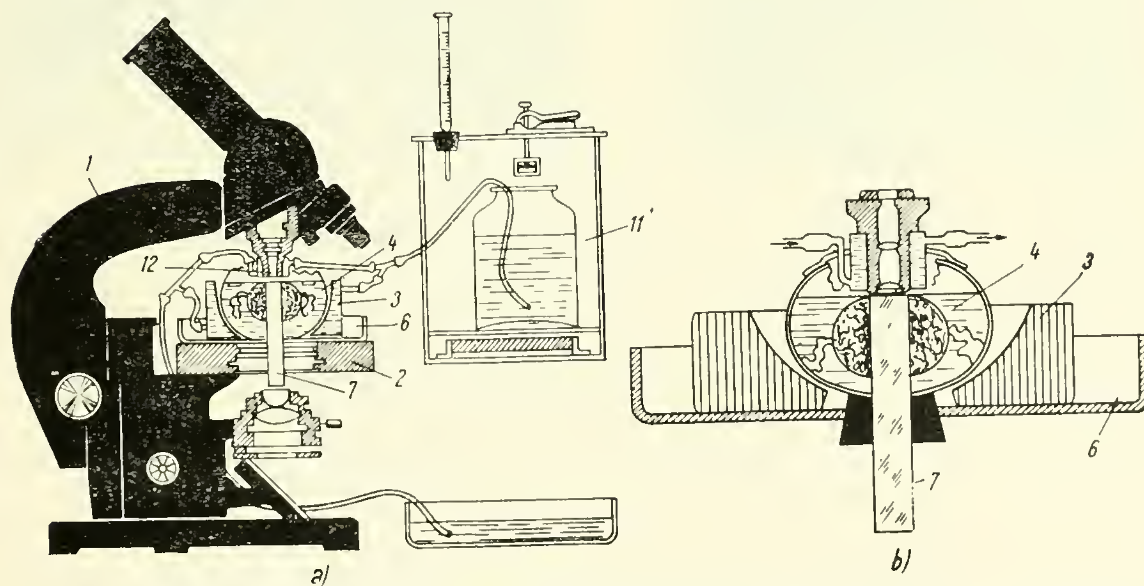


Fig. 34. — Dispozitivul V. I. Sorokin pentru examenul vital al plăcii embrionare. (Din : *Novie danik po probleme razvitia kletoknih i selektonik form ji vora vestestva*, Medghiz, 1954).

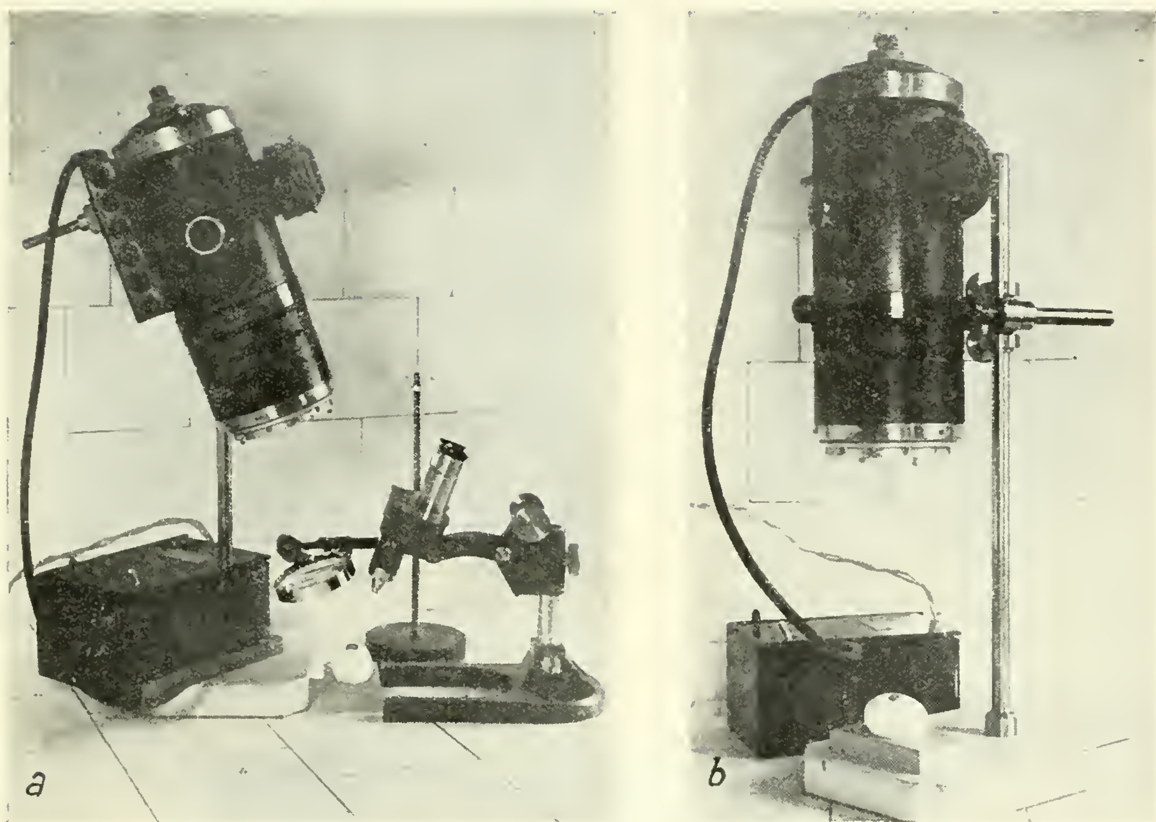


Fig. 35. — *a* — Dispozitiv pentru examenul organelor embrionare în lumina ultravioletă filtrată. *b* — Iradierea embrionului cu raze ultraviolete.



Fig. 36. — Mezonefrosul embrionului de găină de 7 zile, incubaţie. Fotografie în lumina Wood.

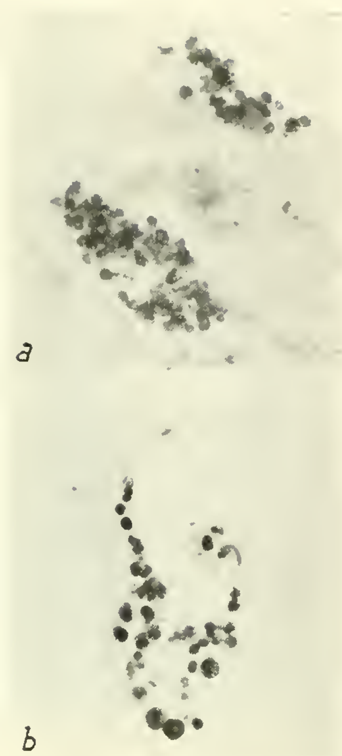


Fig. 37. — Celulele embrionare colorate vital cu roşu neutru. S-au colorat incluzii citoplasmatice, picături lipidice.



Fig. 38. — Imaginea tubului neural şi a somitelor. Embrion viu de 50 de ore de incubaţie, după coloraţie vitală cu albastru de Nil. Termostatul de ou, ultropac.



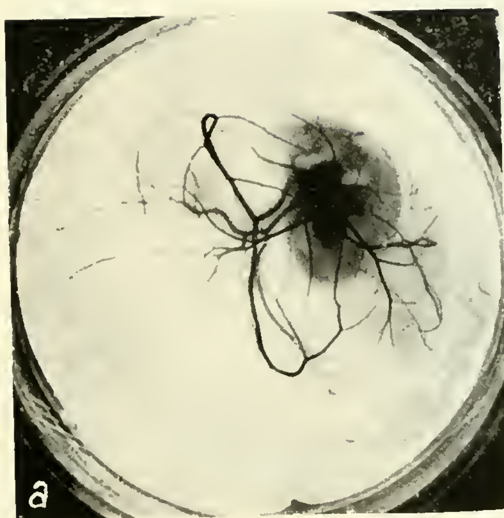
Fig. 39. — Colorația vitală a embrionului cu ajutorul purtătorului de colorant de agar. Embrion de 3 zile de incubație. Portcolorantul de agar — cu albastru de Nil — este depus pe corpul embrionului, lăsînd neacoperite numai capul și o parte a porțiunii caudale a corpului embrionului. Pentru demonstrație, dimensiunile portcolorantului sînt exagerate. Fotografie luată prin fereastra tăiată în coaja oului.



Fig. 40. — Același embrion, după 10 minute. Portcolorantul a fost îndepărtat. Regiunea vital colorată, net delimitată, contrastează cu porțiunile palide, rămase necolorate. Se recunosc: somitele, tubul neural, cutele amniotice, tubul cardiac etc.



Fig. 41. — Același embrion (imagine mărită). Se remarcă finețea contururilor organelor colorate vital.



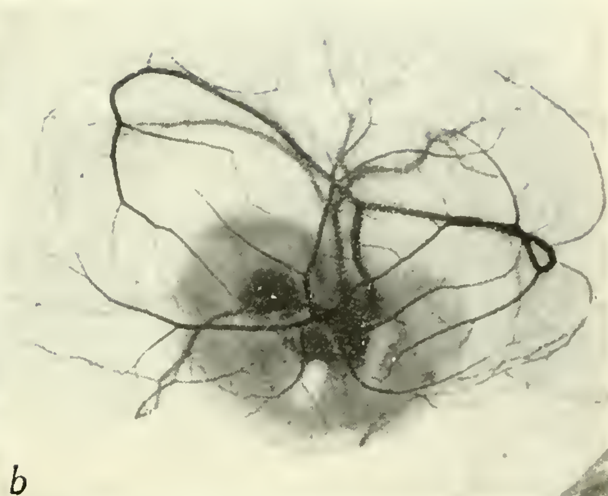


Fig. 43. — Aspectul embrionului transvazat în a şaptea zi de incubaţie.

a — Alantoida acoperă embrionul învelit de amnios; a început scufundarea vaselor viteline. *b* — Acelaşi embrion imagine mărită.

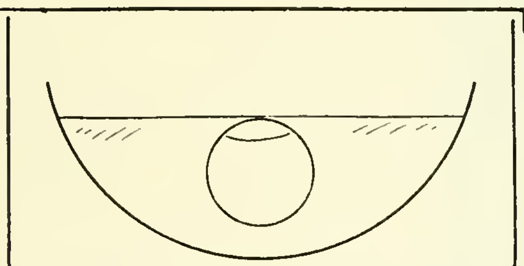


Fig. 42. — Schema oului „transvazat".



Fig. 44. — Camera umedă pentru observaţia vitală şi umectarea continuă a embrionului şi a ariei sale vasculare scoasă din ou. Formaţiunea embrionară se aşază pe convexitatea sticlei de ceasornic, care se vede înăuntrul cristalizorului. Pe capacul acestuia se vede dispozitivul de umectare.

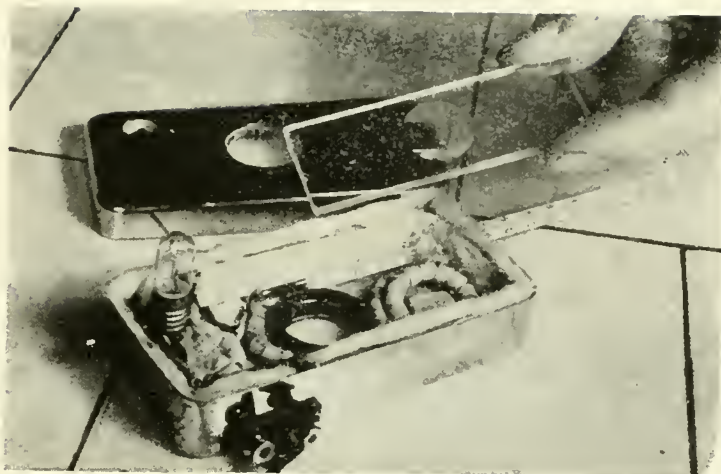


Fig. 45. — Interiorul microtermostatului „de lamă". Modul de a introduce lama, cu cultura de țesut sau placa embrionară vie în microtermostat.

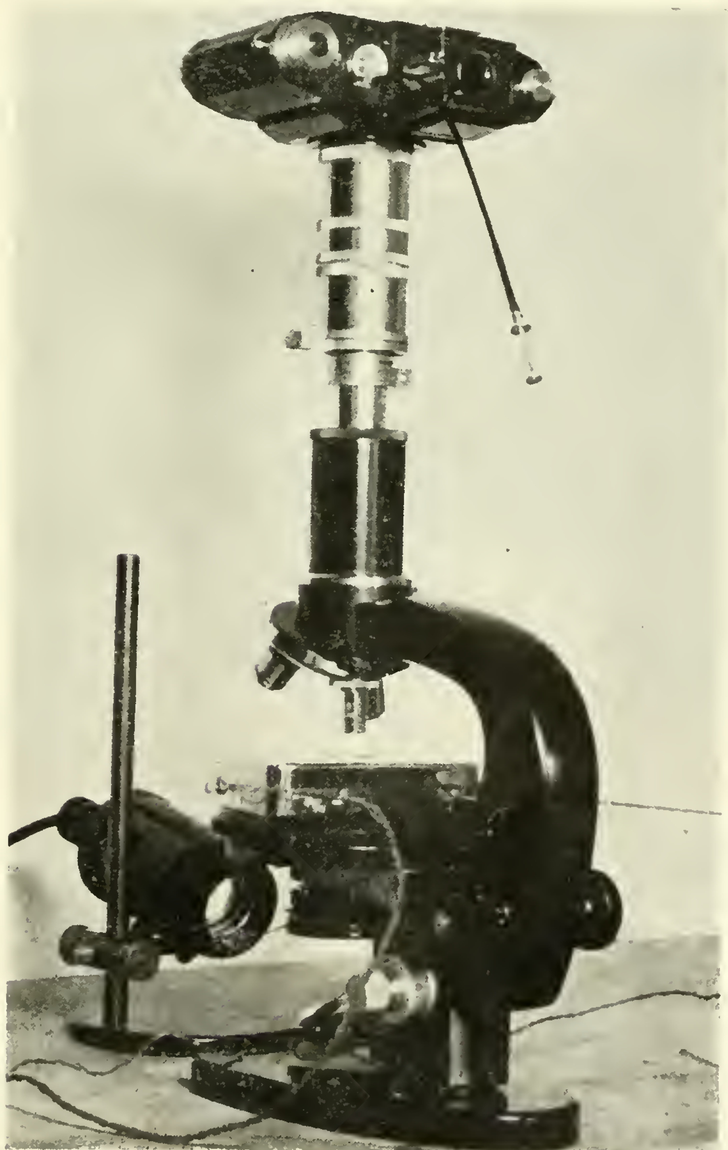


Fig. 46. — Microscop prevăzut cu cameră fotografică, cu oglindă de reflexie și microtermostatul „de lamă".

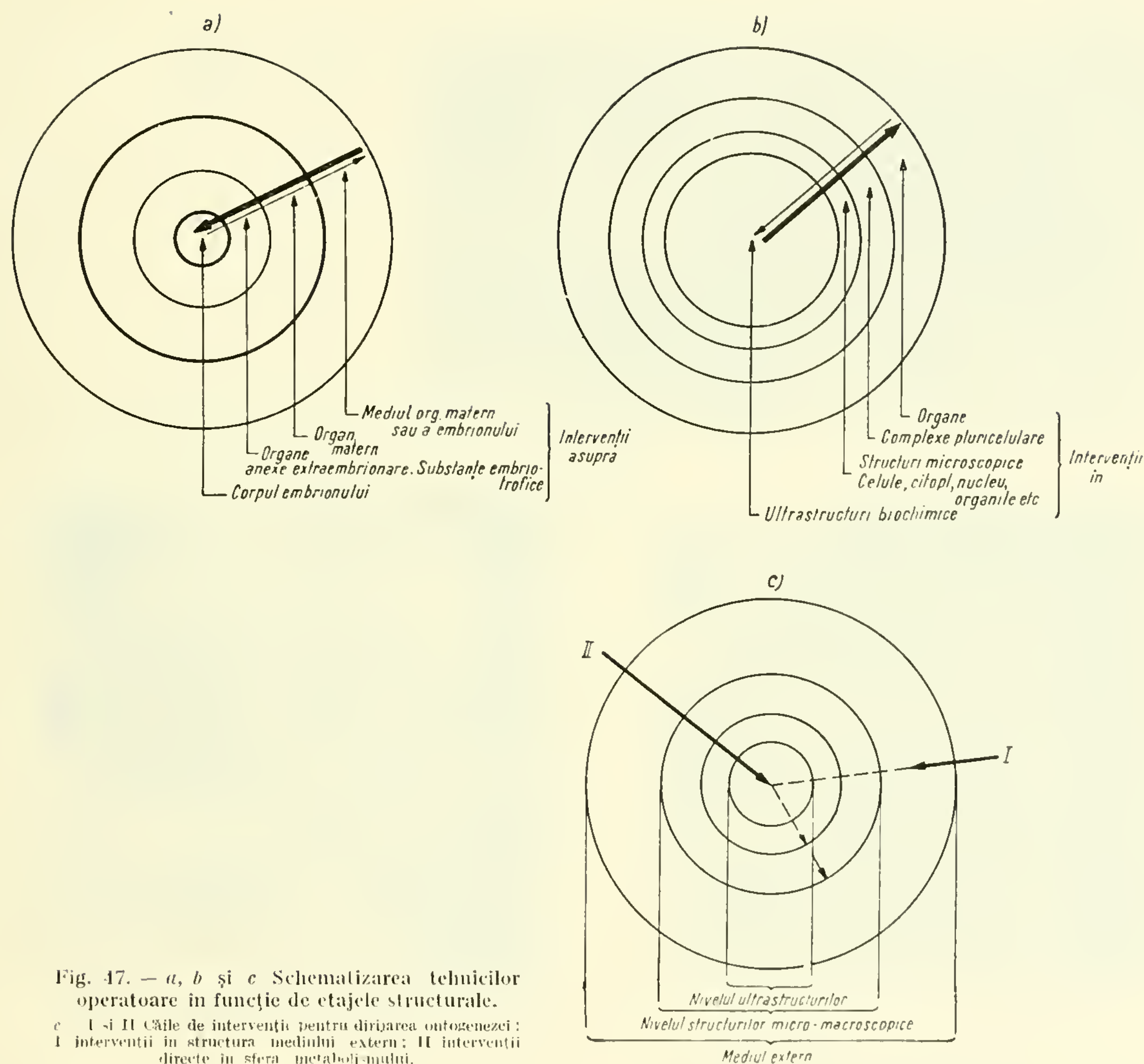


Fig. 47. — *a*, *b* și *c* Schematizarea tehnicilor operatoare în funcție de etajele structurale.

c — I și II Căile de intervenție pentru dirijarea ontogenezei: I intervenții în structura mediului extern; II intervenții directe în sfera metabolismului.

Fig. 48. — Confecţionarea microinstrumentelor de sticlă.



Fig. 49. — „Tragerea" tubului de sticlă.





Fig. 50. — Confecţionarea microinstrumentelor.

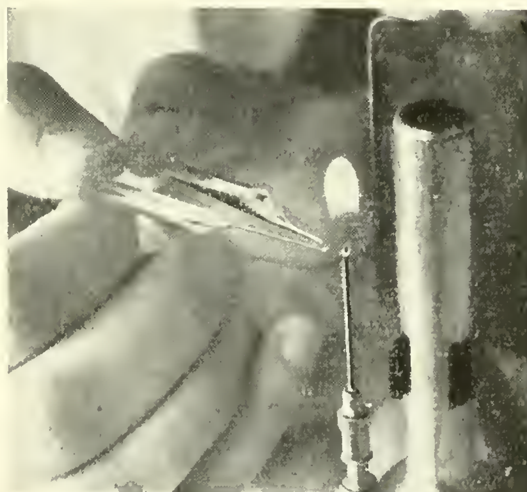


Fig. 51. — Confecţionarea croşetului.

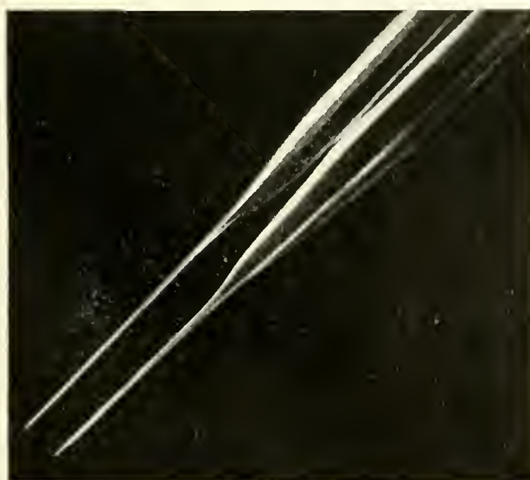


Fig. 52. — Croşetul şi instrumentul „bont".

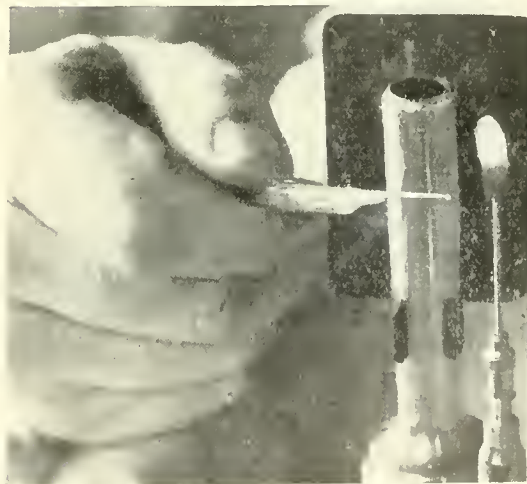


Fig. 53. — Confecţionarea instrumentului „bont".

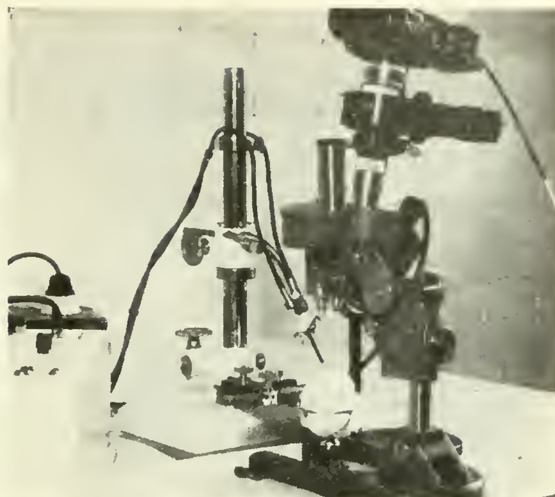


Fig. 54. — Instalaţia de electrotermocauterizare. Rezistenţa reglabilă, instrumentele de cauterizare, cîmpul operator mobil, binocularul cu camera fotografică şi „miflex".

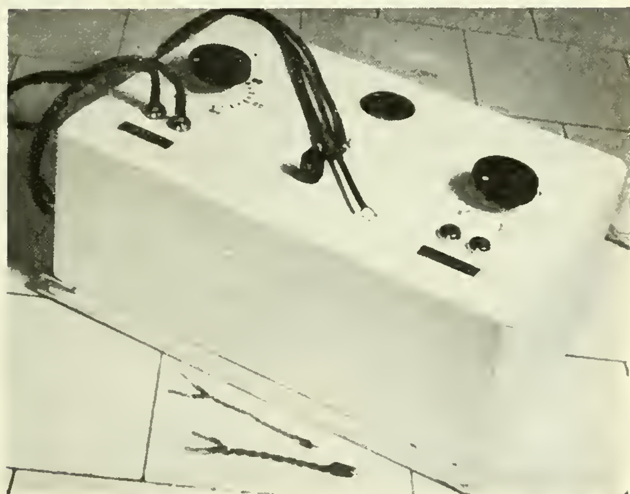


Fig. 55. — Rezistenţa reglabilă şi cauterele.

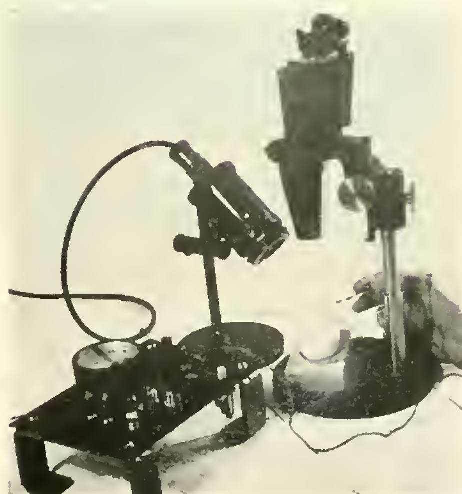


Fig. 56. — Instalaţia de microelectroliză. Polul inactiv se află în albuş; polul activ, alimentat de un curent uniform produs de o baterie, este ţinut în mînă. Se văd voltmetrul şi convertizorul.

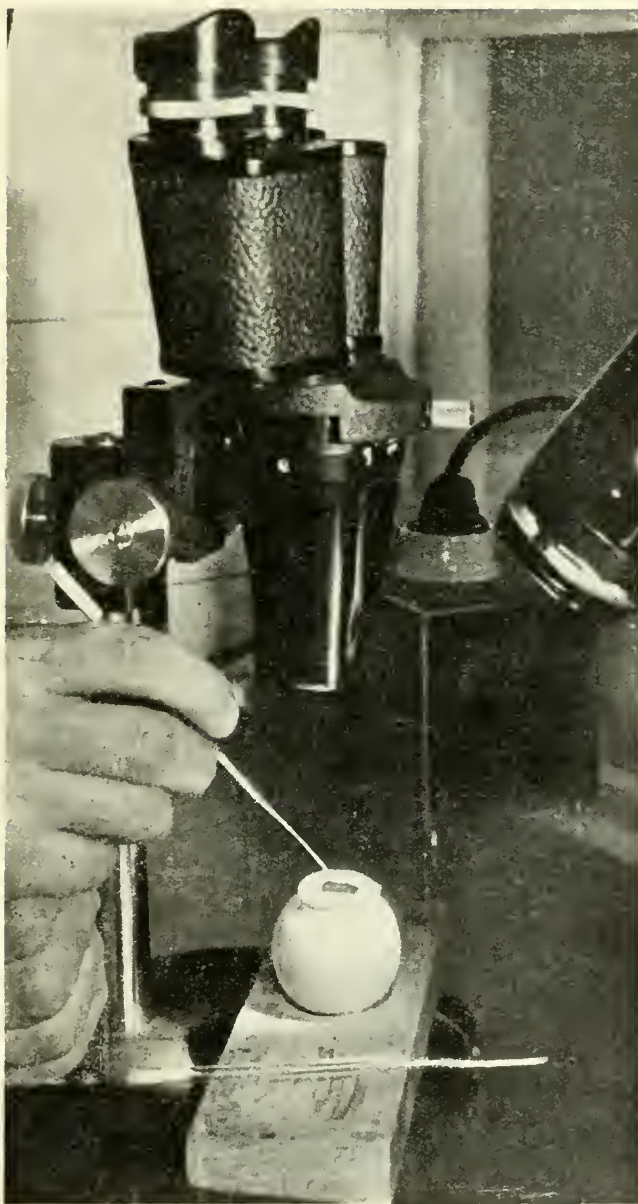


Fig. 57. — Dispozitivul de observaţie şi operaţie, modul de a ţine instrumentul operator în mînă.

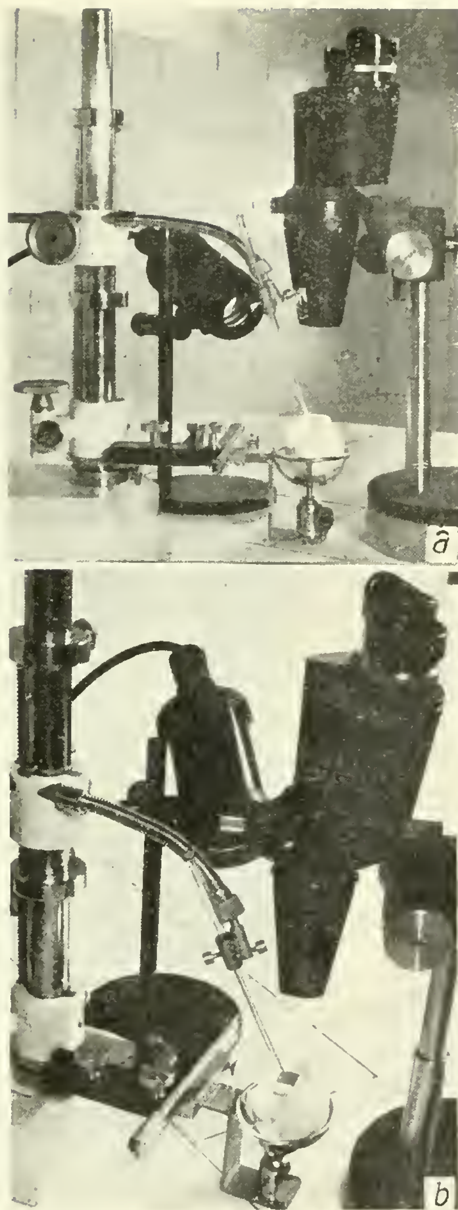


Fig. 58. — *a* — Dispozitiv pentru operaţii cu instrumentul fix şi cîmpul mobil. *b* — Detalii.

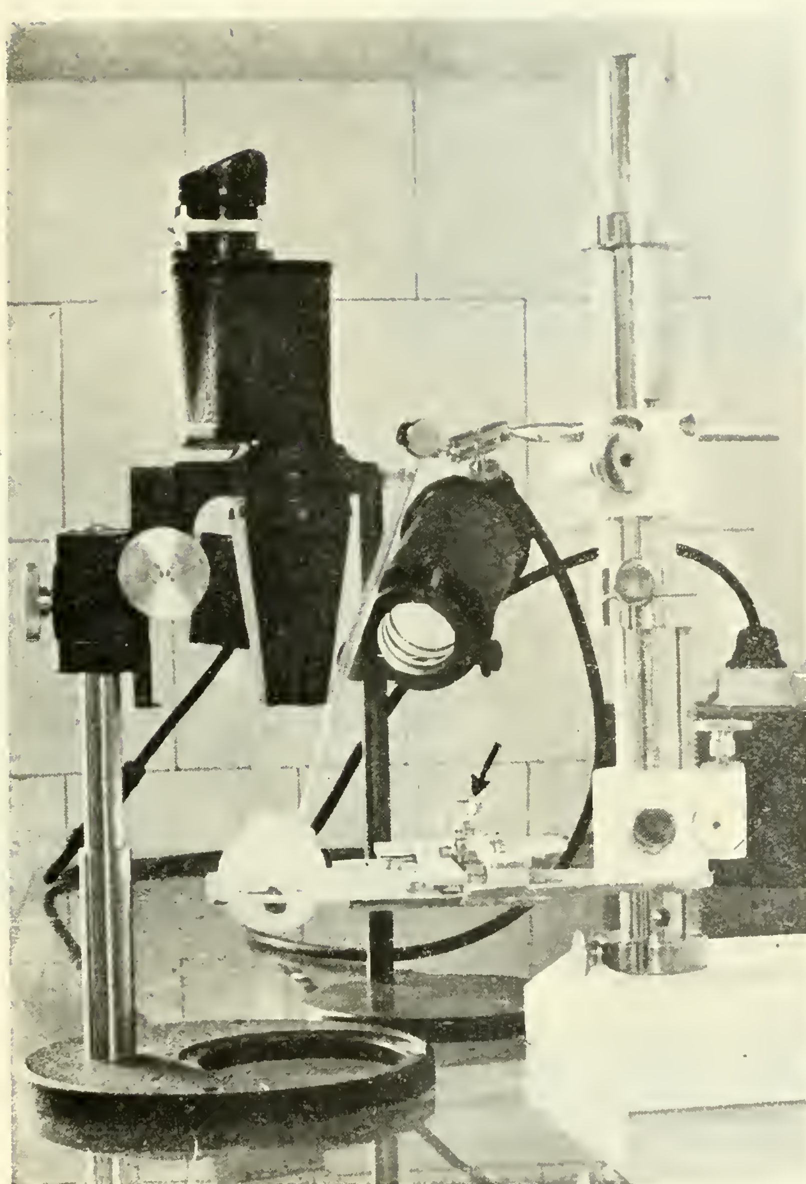


Fig. 59. — Dispozitiv de operaţie cu cîmp mobil şi instrument fix.
La → vizele de manevră.



Fig. 60. — Dispozitiv de operaţie şi electrocauterizare. Instrumentele sînt montate pe braţele micromanipulatorului. Camera fotografică pe unul din ocularele binocularului. Iluminaţie laterală.

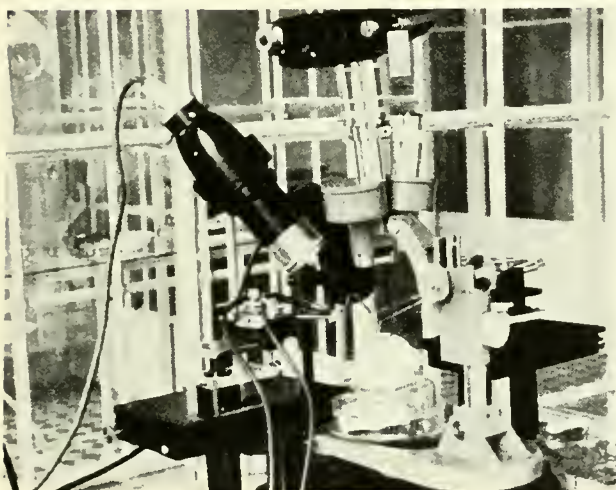


Fig. 61. — Aceeaşi instalaţie. Altă vedere.

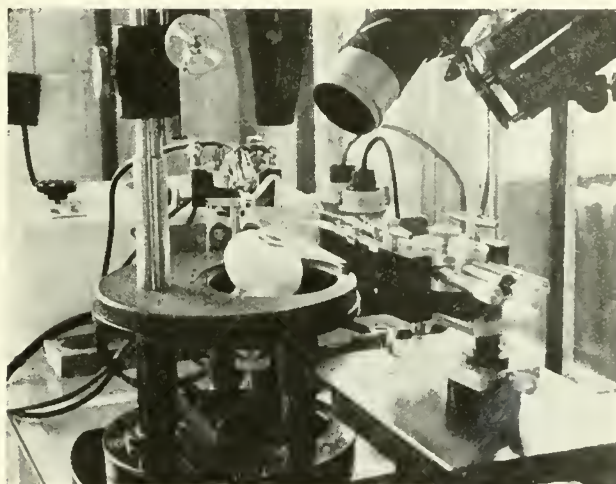


Fig. 62. — Detalii din figura precedentă. Microcauterul de constantan. Firele de alimentare izolate de o masă plastică.

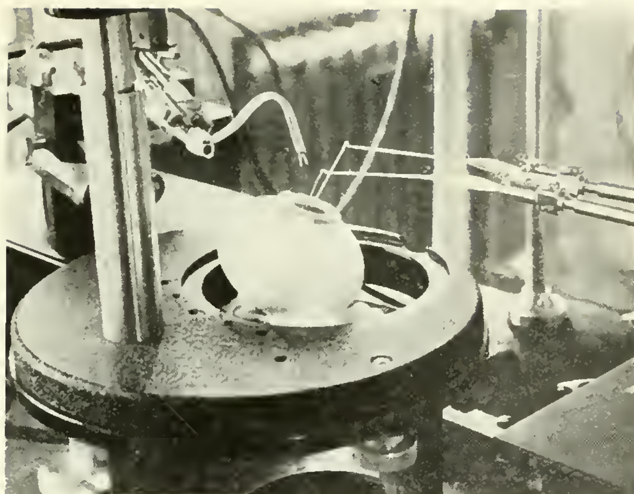


Fig. 63. — Îndepărtătoare de sticlă montate pe micromanipulator.

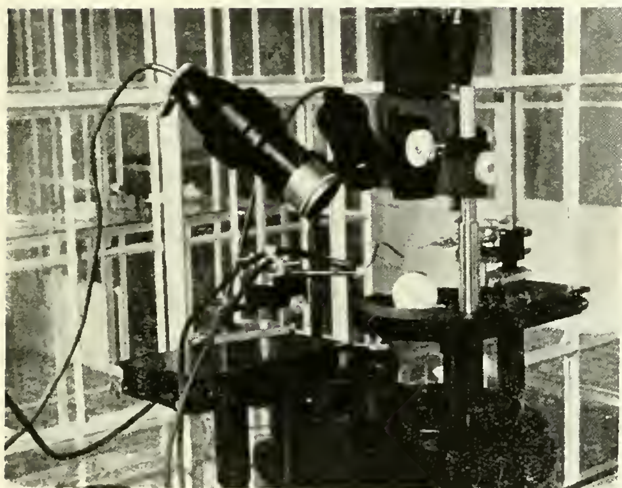


Fig. 64. — Instalația din figurile precedente: altă vedere.

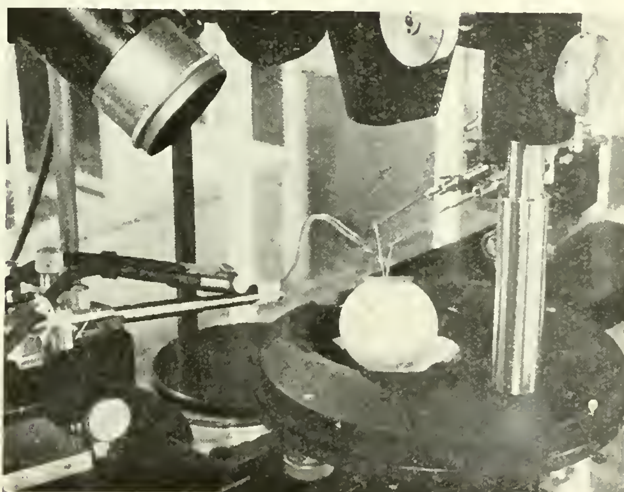


Fig. 65. — Detalii din figura 64.

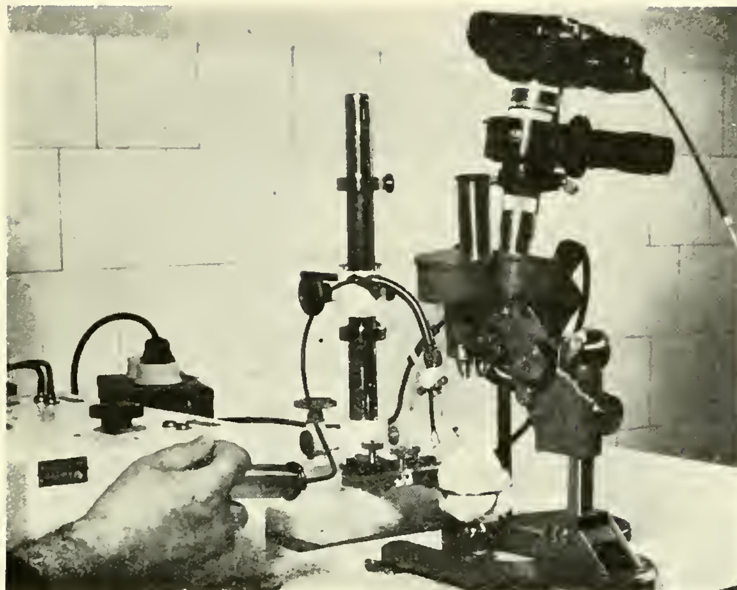


Fig. 66. — Instalaţie pentru injecţii intraembrionare cu canulă fixă şi cîmpul operator mobil. Camera fotografică cu miflex, montată pe unul din ocularele binocularului, permite luarea unor instantanee în timpul operaţiei.

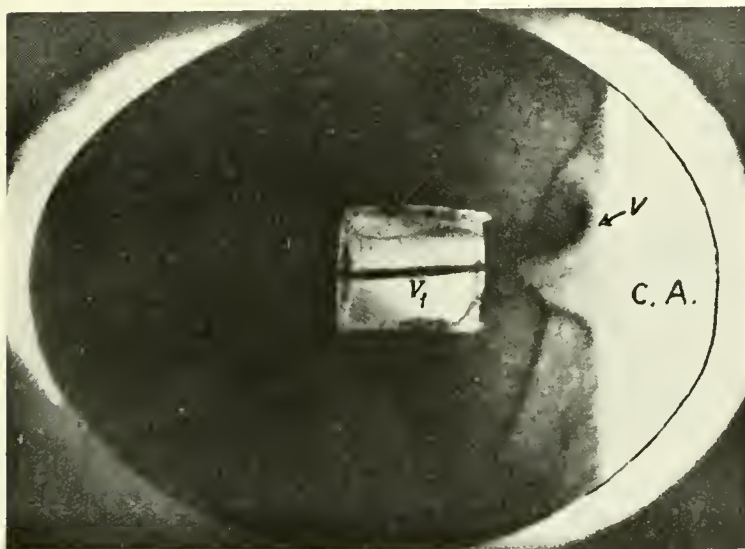


Fig. 67. — Tehnica injecţiei intravenoase într-o venă alantoidiană. Oul în a 11-a zi de incubaţie, transluminat.

C.A. — camera de aer. *V* — vene alantoidiene, vizibile prin transparenţa cojii. V_1 — traiectul venei evidenţiat prin transparentizarea membranei papiracee cu ulei de parafină, înăuntrul ferestrei tăiate în coajă

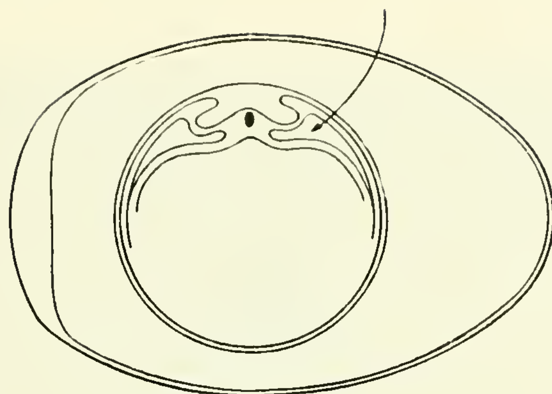


Fig. 68. — Modul de a pătrunde în celomul extraembrionar prin deschiderea unei cute amniotice laterale.



Fig. 69. — Embrionul de găină în a doua zi de incubaţie. Coloraţie vitală cu albastru de Nil. Se văd : tubul neural, somite, vezicula otică, cuta amniotică cefalică acoperind parţial capul. Acul operator în poziţie pentru incizia cutei amniotice craniale.

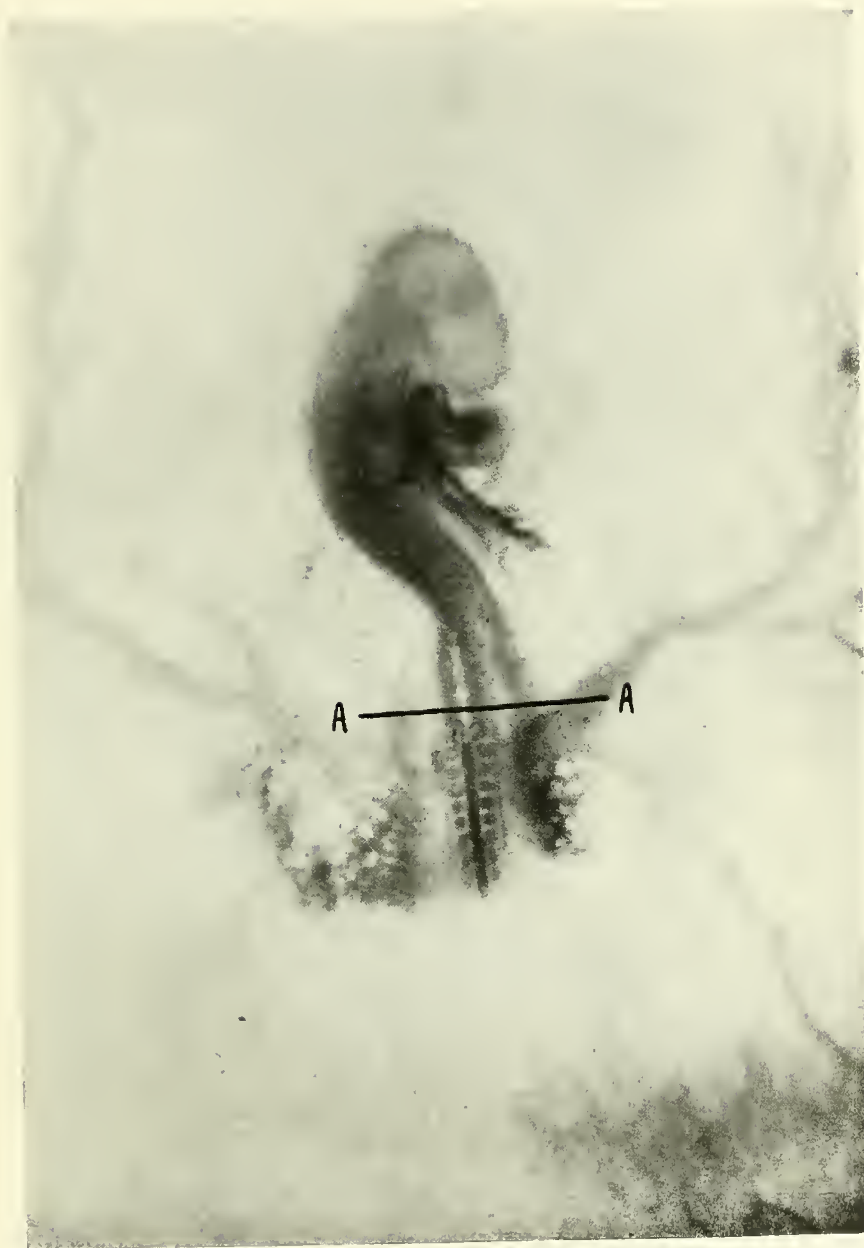


Fig. 70. — Embrionul de găină la începutul celei de-a treia zi de incubaţie. Fotografiat viu. Coloraţie vitală cu albastru de Nil.

AA — locul secţiunii transversale din fig. 71.

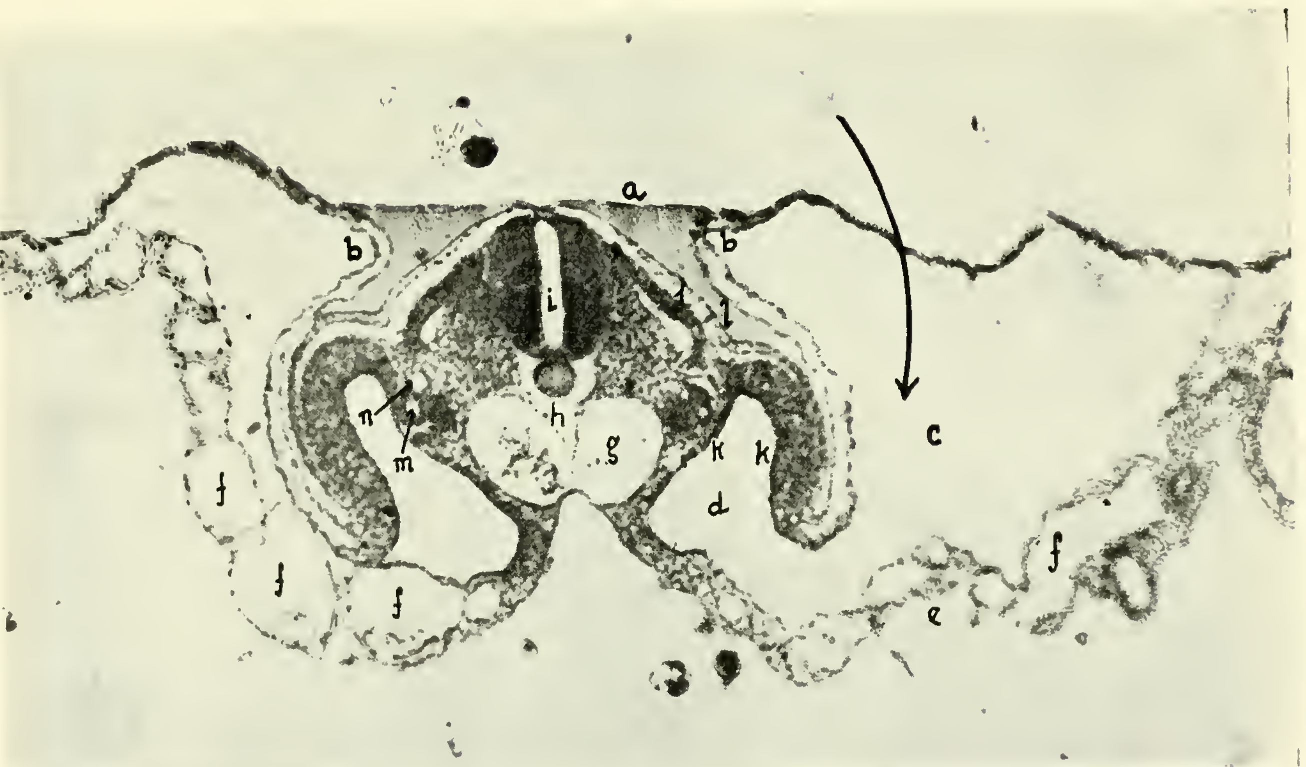


Fig. 71. — Embrionul de găină la începutul celei de-a treia zile de incubaţie. Secţiune transversală, cranial de emergenţa arterelor viteline, aproximativ la nivelul liniei *AA* din fig. 70.

a — Membrana vitelină. *b* — Cutele amniotice formate din ecto- şi mezoderm. *c* — Celomul extraembrionar. *d* — Celomul intraembrionar. *e* — Endodermul. *f* — Vase viteline. *g* — Două aorte. *h* — Coarda. *i* — Tub neural. *j* — Somite. *k* — Mezoderm: somatopleura şi visceropleura. *l* — Ectoderm tegumentar. *m* — Canalul Wolf. *n* — Canalicul segmentar al organului Wolf (mezonefros).



Fig. 72. — Operaţia de mielorahischizis. — Coloraţia vitală a breşei amniotice.



Fig. 73. — Deschiderea breșei amniotice.



Fig. 74. — Amniosul este redeschis, cutele sale îndepărtate lateral.

15 — c. 1778



Fig. 75. — Operația de mieloschizis. Tubul neural se deschide cu instrumentul operator.



Fig. 76. — Aspect după sfîrșitul operației din fig. 70.

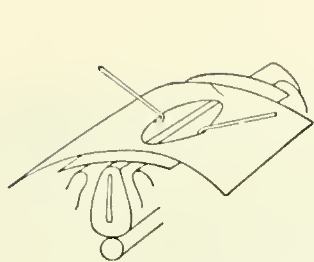


Fig. 77. — Fazele operației de mieloschizis (schemă). Incizia membranei viteline.

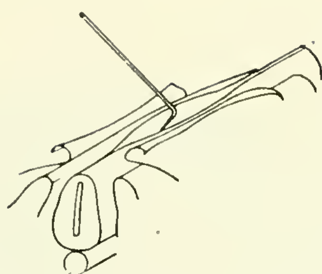


Fig. 78. — Epidermul tegumentar incizat și îndepărtat. Acul operator deschide tubul neural.

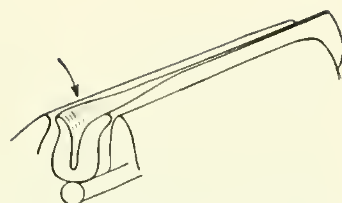


Fig. 79. — Tubul neural e deschis.



Fig. 80. — Așezarea celor două lupe binoculare pentru executarea transplantărilor embrionare.



Fig. 81. — *a* — Tegumentul embrionar al rasei Plymouth, transplantat pe membrana corion-alantoidiană.
b — Acelaşi transplant după 48 de ore.

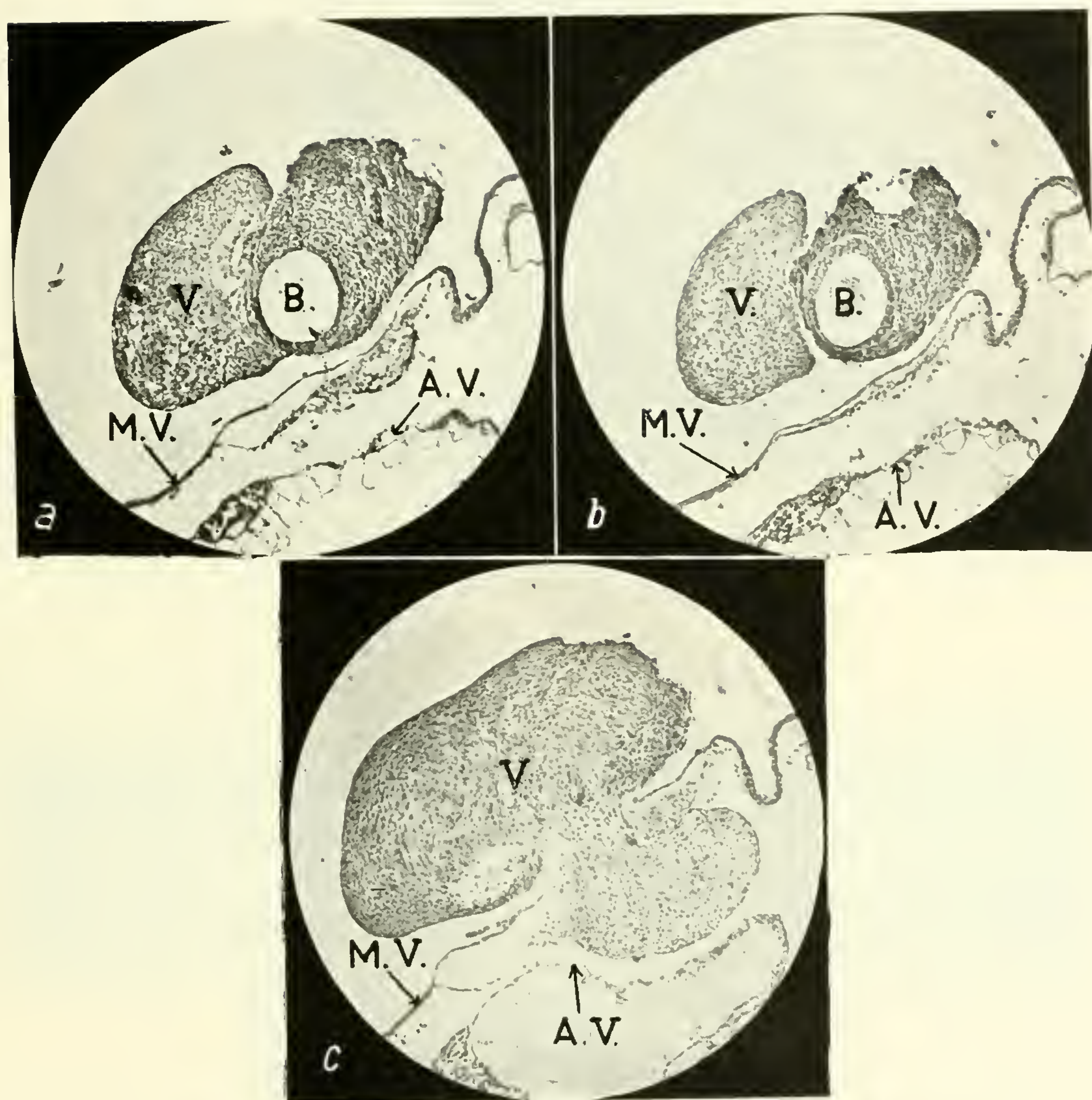


Fig. 82. — *a*, *b* şi *c* — Inima unui embrion de găină de 3 zile, implantată pe aria vasculară vitelină.

V — ventricul. *B.* — bulb. *M.V.* — membrana vitelină. *A.V.* — aria vasculară. În *c.* revărsarea mioblaştilor sub membrana vitelină.

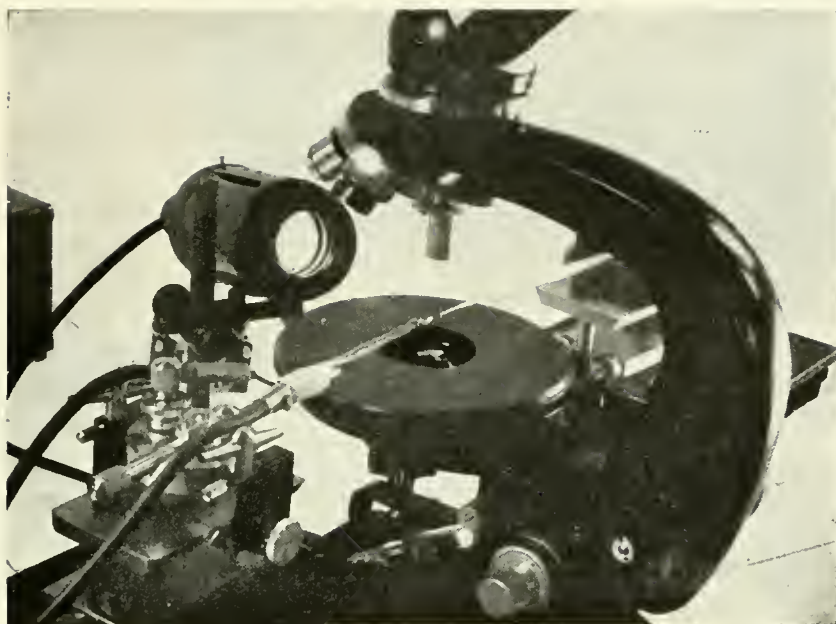
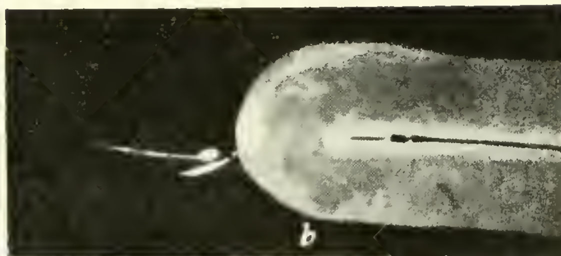


Fig. 83. — Micromanipulare. Se văd: acul de sticlă în dreapta şi ansa de platină încălzită în stînga, montate pe braţele micromanipulatorului.





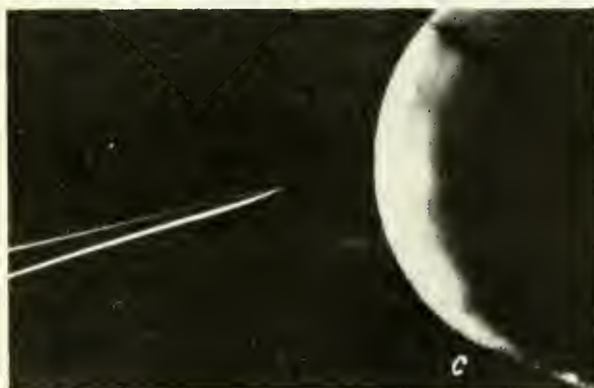


Fig. 84. — *a*, *b* şi *c* — Modul de a obţine vîrful de sticlă pentru micromanipulare.

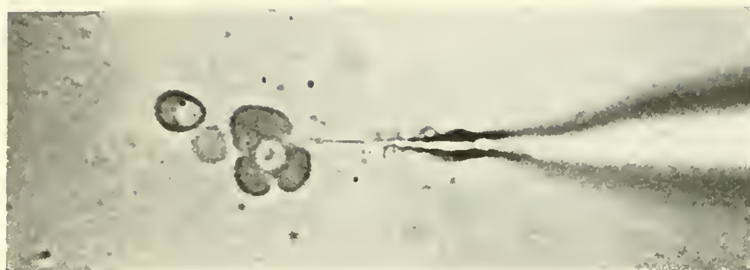


Fig. 85. — Secţionarea unui eritrocit.

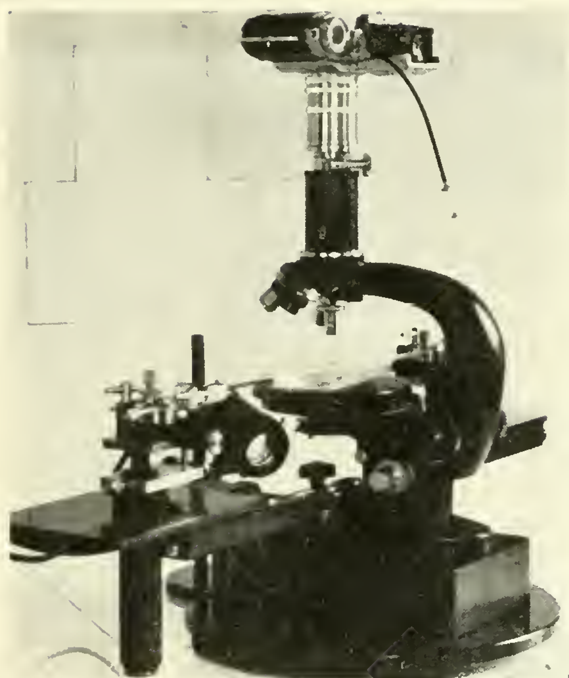


Fig. 86. — Micromanipulare. Vedere de ansamblu a instalaţiei. Camera de ulei, instalaţia fotografică

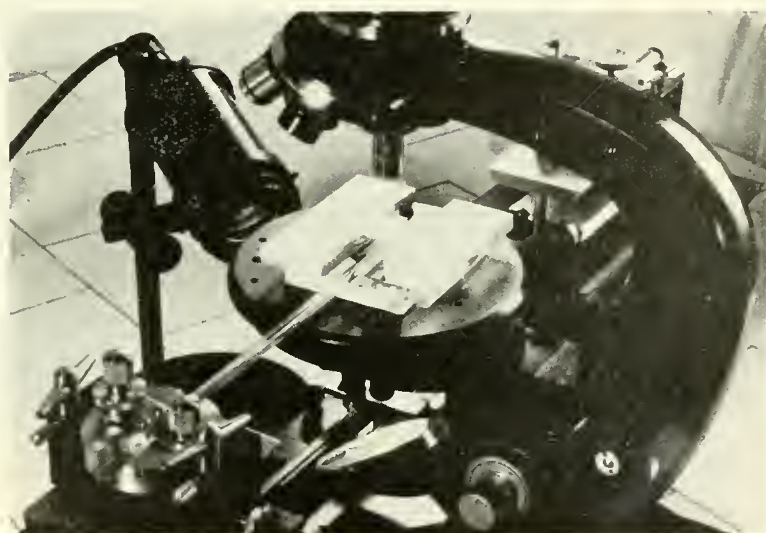
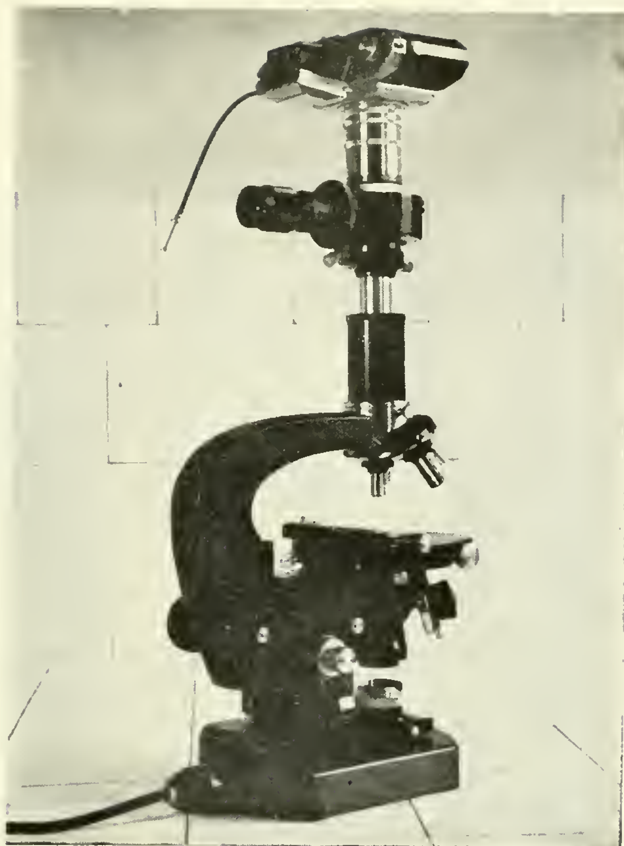


Fig. 87. — Detaliile camerei de ulei.

Fig. 88. — Microscopul lumipan, prevăzut cu dispozitivul fotografic, compus din cameră cu oglindă și vizorul miflex.



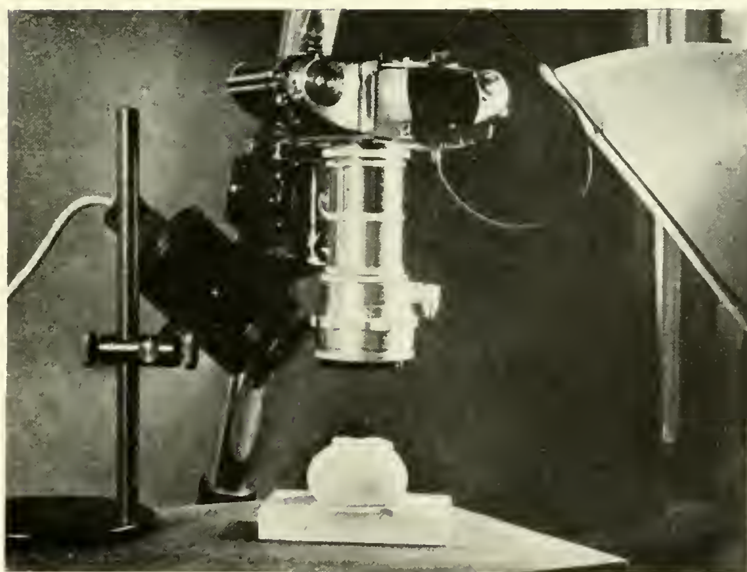


Fig. 89. — Instalație pentru fotografierea embrionului viu *in situ*. Camera cu oglindă de reflexie, inelele de prelungire, obiectivul, iluminație laterală.

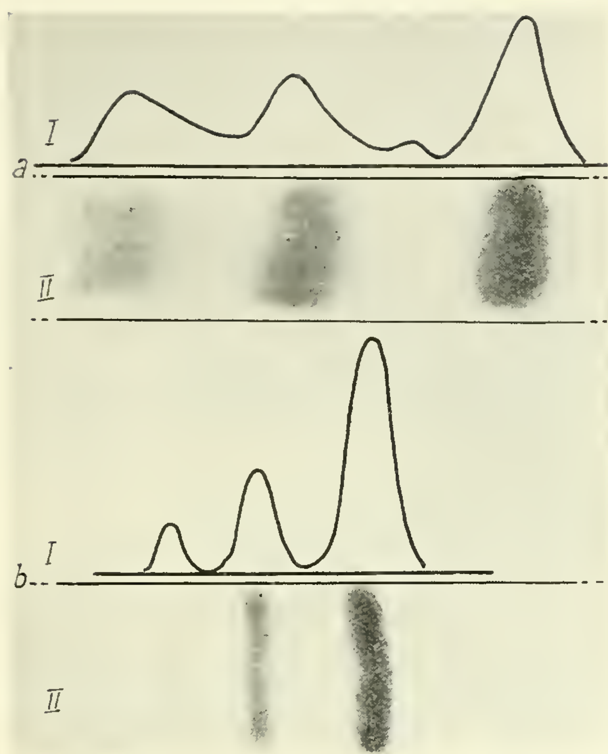


Fig. 90. — Electroforeză pe hîrtie. *a* — ser de embrion de găină de 14 zile de incubație. *b* — albuș de ou de găină Leghorn.

I — evaluarea cantitativă (curbă) obținută la electrocardioscop. *II* — hîrtia de filtru cu fracțiuni protidice după developare.

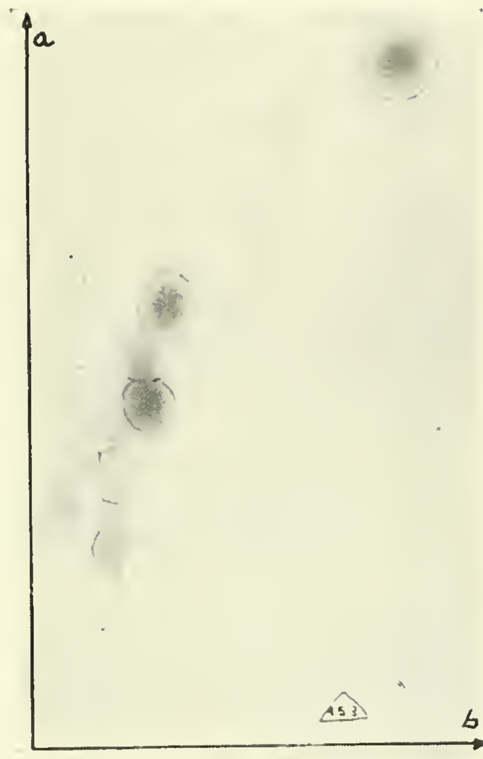


Fig. 91. — Cromatografia pe hîrtie (bidimensională). Aminoacizi din hidrolizatul de protide din mușchii puiului de găină de 2 zile. *a* — Fenol/H_2O. *b* — Butanol/ac. acetic/H_2O.

ANEXA 1

CLASIFICAREA METODELOR ȘI TEHNICILOR ÎN EMBRIOLOGIA EXPERIMENTALĂ, PE BAZA PRINCIPIULUI ETAJELOR STRUCTURALE

Înfățișarea organismului în etaje structurale. Conceptul lărgit al morfologiei, cuprinzînd și structurile submicroscopice, dincolo de puterea de rezolvare optică. Morfogeneza privită sub raportul dezvoltării etajelor structurale. Sistematizarea metodelor experimentale în embriologie după criteriul etajului structural căruia ele i se adresează inițial.

Formele și structurile organismului, și în mod deosebit de evident ale embrionului, apar și se dezvoltă în decursul ontogenezei, ca efect morfologic al interacțiunilor tuturor componenților complexului ontogenetic[1].

Dezvoltarea necontenită a acestor interrelații determină și dezvoltarea formelor. Din acest punct de vedere, formele și structurile trebuie concepute ele înseși ca procese ce se desfășoară în timp.

Cît de stabilă ar apărea o formă organică, ea există numai în prezența unor condiții sau factori care o întrețin și o dezvoltă, și se pierde (sau se modifică) de îndată ce aceste condiții dispar sau se schimbă.

Prezentarea formelor și structurilor organismelor se poate face în două feluri :

1. Înfățișînd forma în mod obișnuit, anatomo-topografic, tridimensional, în diferitele ei etape de dezvoltare, ceea ce corespunde imaginilor noastre obișnuite macro- și microscopice.

2. Înfățișînd formele și structurile organismului în etaje morfologice.

Mulți autori (îndeosebi F r e y - W y s s l i n g) au subîmpărțit morfologia în domenii aparținînd anumitor ordine de mărimi. Această metodă, pe care o numim „de etajare”, este conformă concepției materialist-dialectice a dezvoltării formelor normale și patologice și pentru înțelegerea formei ca proces.

Este deci necesar să insistăm asupra înfățișării organismului în etaje structurale (sau niveluri morfologice), înfățișare care poate fi pusă în legătură cu principiul structurali-

---

[1]) Complex ontogenetic : embrionul, anexele sale, factorii mediului său apropiat și îndepărtat, cu care se stabilesc interrelații.

tății emis de Pavlov — raportarea procesului la structură și bineînțeles în același timp cu raportarea structurilor la proces, unul din cele trei principii materialiste ale învățăturii sale.

Aplicarea principiului structuralității necesită un concept lărgit al morfologiei, care cuprinde — pe lîngă domeniul macro- și microformelor — și vastul domeniu al structurilor macro- și micromoleculare, adică domeniul leptonic [1]).

Structura cuprinde totalitatea domeniilor morfologice, în sînul cărora cel macro- și microscopic constituie — conform concepției pe care o dezvoltăm aici — morfologia în sensul mai restrîns. Este clar că conceptul lărgit al morfologiei, legat de principiul structuralității, reprezintă de fapt o sinteză între anatomie, histologie, citologie, biochimie și leptonică.

Se observă că formele și structurile organismului, studiate în anatomie, histologie, fizico-chimie și chimie biologică, se pot așeza de-a lungul unei scări de mărimi, unei scări pur cantitative, care pornește de la domeniul mărimilor centimetrice, trece prin domeniul milimetrilor și al micronilor și ajunge pînă la cel al milimicronilor. De-a lungul acestei scări cantitative putem grupa formele și structurile organismului în diferite domenii de mărimi (etaje morfologice).

Dacă se ia, de exemplu, un mușchi striat scheletic, macroscopic, în cadrul domeniilor de mărimi centimetrice și milimetrice, acesta apare compus din fascicule musculare învelite de o fascie comună. Aceste forme : mușchi întreg, fasciculele sale și fascia, nu depășesc un cadru centimetric sau milimetric.

Fiecare fascicul muscular, la rîndul său, învelit într-un *perimiziu*, este compus din fibre musculare (lăsăm aici la o parte vasele, nervii etc.). Fibra musculară apare ca o formă aparținînd unui domeniu morfologic „subiacent".

Lărgimea ei încape într-un cadru micronic. Fibra musculară este compusă, la rîndul ei, din mănunchiuri de fibrile musculare, care la rîndul lor rezultă din fascicularizarea unor macromolecule filamentoase, forme din domeniul morfologic milimicronic (leptonic).

S-ar părea că avem aici de-a face cu o recapitulare de forme asemănătoare (mușchiul, fasciculul muscular, fibra musculară, fibrila musculară, macromolecula filamentoasă), care se găsesc în adîncimea structurală a organului, de-a lungul unei dimensiuni morfologice, una conținînd inclusă pe cealaltă următoare (principiu numit de Heidenhain „encapsis"). Este oare acesta modul corect de a concepe legătura dintre anatomia, histologia și chimia fizică, chimia biologică a mușchiului, pe de o parte, și, pe de altă parte, legătura dintre contracția musculară globală (macroscopică) și mecanismul intim al contracției pe planul ultrastructural? Desigur că *nu*, și iată de ce :

La trecerea de la un domeniu morfologic la celălalt următor, pe scara cantitativă a mărimilor („dimensiunea morfologică"), scară care ne duce în adîncimea structurală a organului sau organismului întreg, valoarea funcțiilor și formelor nu se schimbă și ea pur cantitativ (mușchi, mușchi microscopic, mușchi ultramicroscopic), ci dimpotrivă, formele care apar succesiv la trecerea unor niveluri critice pe scara cantitativă dimensională se deosebesc și calitativ între ele.

Un alt exemplu va ilustra cele afirmate.

Din forma globală macroscopică a femurului (fig. 92) putem deduce, în mod just, o bună parte a funcțiilor sale. El apare adaptat să suporte greutatea corpului și tracțiunile inserțiilor musculare. Structura trabeculară oferă chiar ochiului liber posibilitatea de a aprecia repartizarea împovărărilor mecanice la care este adaptat femurul.

[1]) λέπτος = fin. Lepotonică : domeniul ultrastructurilor.

Analizînd osul de-a lungul dimensiunii morfologice (făcînd un sondaj în adîncimea sa structurală) găsim osteonul, vase și nervi, formațiuni calitativ noi, cu funcțiile lor specifice. Mergînd mai adînc pe scara dimensională se ajunge, în domeniul micronic, la o nouă grupă de forme calitativ noi, morfologic și funcțional specializate : celule, fibre și substanța intercelulară. Mai jos, pe scara dimensională apare un nou domeniu de forme, trecînd de un nivel critic în jurul a 100 microni, domeniul structurilor fine, leptonice, alcătuiri macromoleculare. La acest nivel structural începe vastul domeniu al unei morfologii încă incomplet explorate, domeniul formelor macro- și micromoleculare cu funcțiile lor caracteristice.

La prima vedere ar putea să apară nepotrivită gruparea formelor în domenii caracterizate după puterea de rezolvare a ,,instrumentului'' principal de cercetare (ochiul, microscopul etc.), adică a atribui puterii de rezolvare a unui instrument de cercetare valoarea de criteriu pentru calitatea obiectului cercetat. Însă formele calitativ diferite care se găsesc realmente în adîncimea structurală a organismului sînt realități obiectiv existente, care au necesitat diferențierile succesive ale diferitelor tehnici. Complexele morfologice găsite succesiv de-a lungul dimensiunii morfologice în etajele structurale ale organismului nu reprezintă o simplă sumație a părților lor constitutive. Forma caracteristică pentru un domeniu ,,superior'' nu este simpla sumă a formelor din domeniul subiacent. Ea constituie o adevărată calitate nouă morfo-funcțională.

Este important să se sublinieze că analiza morfologică descrisă servește nu numai ca un simplu vector de analiză în profunzime a unei structuri vii, ci că această analiză are și valoare pentru înțelegerea dinamică a proceselor ontogenetice evolutive normale și patologice. Într-adevăr, procesele de ontogeneză, procesele de regenerare și cicatrizare, creștere normală și patologică etc., comportă treceri succesive ale materiei vii prin diferitele etape structurale morfo-funcționale descrise.

Ne apare acum în mod clar și calea spre o sinteză a disciplinelor morfologice. De-a lungul ,,dimensiunii morfologice'' apar formele și structurile tipice ale organismului viu la puncte critice (nivele morfologice) care se găsesc pe scara continuă a ordinelor de mărimi. De-a lungul acestei scări pur cantitative și continue apar forme calitativ diferite, cu funcțiile lor corespunzătoare.

Se vede imediat că fiecăreia dintre aceste forme îi corespunde o metodică de investigație specială. Sondajul descris permite înfățișarea organismului întreg în structuralitatea lui ca un sistem de etaje morfologice calitativ diferite. Fiecărui etaj morfologic îi corespunde, bineînțeles, și unul funcțional.

După înfățișarea organismului în întregimea lui ca o unitate cu structuri etajate, se va încerca acum *raportarea dinamică a unei funcții la structură* (P a v l o v).

Făcînd de exemplu un ,,sondaj'' în adîncimea structurală a organismului în timpul desfășurării unui act reflex motor normal, se va constata imediat că procesul fiziologic cuprinde în desfășurarea lui etajele structurale diferite ale organismului.

În timpul actului reflex motor, de pildă, baza morfologică structurală a arcului reflex aparține mai întîi domeniului ultrastructurilor (leptonic) din cuprinsul sistemului nervos. De aici procesul se extinde asupra ultrastructurilor musculare, de unde cuprinde succesiv și domeniul microscopic și cel macroscopic, manifestîndu-se în cele din urmă prin fenomenul macroscopic al contracției musculare globale. Se constată deci că o parte a procesului se petrece în domeniul ultrastructural, iar o altă parte cuprinde structurile situate succesiv în straturile morfologice din ce în ce mai ,,înalte'', pe scara dimensională, atingînd și domeniul macroscopic. Procesul se desfășoară deci nu numai în timp,

ci și în etaje morfologice diferite ale unui întreg structural, schimbîndu-se calitativ la trecerea unor hotare „critice". Dinamica proceselor funcționale poate cuprinde organismul întreg în diferitele sale etaje morfologice. Conceptul structuralității ușurează astfel înțelegerea expresiei morfologice a unității organismului, a interacțiunii dintre toate părțile lui.

Din punct de vedere morfologic, stadiile prelezionale ale unui proces patologic sînt, de multe ori, perioade de desfășurare ale procesului patologic în etajul ultrastructural (leptonic), de unde se pot dezvolta mai departe. Perioada lezională începe cu depășirea hotarelor domeniului micro- și mai tîrziu macroscopic, cînd procesul patologic intră — ca expresie morfologică — în cîmpul optic al anatomiei patologice.

Astfel, prima manifestare microscopică a unui proces patologic la embrion nu trebuie să coincidă cu începutul lui real, ci apare de cele mai multe ori, ca un „vîrf" care a depășit nivelul ultrastructural.

Diferențierea morfologică normală este precedată, la embrion, de o diferențiere biochimică (chemodiferențiere). Această chemodiferențiere, fără a prezenta o „preformare" chimică a viitoarei structuri microscopice sau macroscopice constituie însă în multe cazuri o treaptă ontogenetică premergătoare acestora.

Apariția structurii specifice în etajul morfologic microscopic are, deci, semnificația unui salt calitativ morfo-funcțional la depășirea hotarului critic dintre etajul morfologic ultrastructural (leptonic) și etajul microscopic.

Cunoașterea condițiilor necesare acestor salturi constituie unul din obiectivele cele mai importante ale embriologiei experimentale. Din păcate, în stadiul cunoștințelor noastre de astăzi, legăturile cauzale dintre procesele biochimice și cele morfogenetice micro- și macroscopice nu sînt încă clarificate.

Diferitele metode și tehnici ale intervențiilor experimentale asupra embrionului pot fi grupate luînd drept criteriu etajul structural, căruia aceste metode sau tehnici i se adresează inițial.

Astfel, metodele biochimice și biofizice se adresează, în cea mai mare parte, etajului ultrastructural (leptonic), fiindcă prin aceste metode se intervine asupra grupărilor atomice, moleculare, macromoleculare. Metodele de intervenție directe mecanice sau termice etc. (microchirurgicale) se adresează formelor și structurilor din domeniul micro- sau micromacroscopic.

Schemele din figura 47 înfățișează sistematizarea intervențiilor experimentale, avînd drept criteriu orbita complexului ontogenetic in care se intervine inițial.

În principiu pot fi influențate toate părțile complexului printr-o intervenție în oricare din orbitele sale.

Practic trebuie însă ales momentul intervenției și latura principală a sistemului interacțional, într-un moment dat, pentru a obține efectul dorit și cu intensitate suficientă.

Indiferent în care sferă intervenim inițial, în ultima linie se va resimți metabolismul, reprezentat în schemă prin sfera cea mai internă.

Schema înfățișează justificarea tuturor genurilor de intervenții : în structura mediului extern, în organismul parental, în mediul apropiat embrionului, în organele sale extraembrionare, în corpul embrionului, în complexele multicelulare, în structurile microscopice, și în ultrastructurile substanței vii.

Sînt însă două căi care apar deosebit de apte, pentru intervenții menite să dirijeze ontogeneza : intervenții în structura mediului extern și în curentul de asimilare, de „interiorizare" ontogenetică, și intervenții directe în sfera metabolismului.

Modificările metabolismului vor putea influența, la rîndul lor, structura morfo-funcțională a embrionului.

Toate aceste metode au deci justificarea lor, cu toate că valoarea lor poate fi inegală pentru cercetarea unei probleme concrete. Dar rezultate sintetice nu pot fi obținute decît prin justa lor îmbinare.

Apreciind din plin marea importanță pe care o au pentru studiul proceselor ontogenetice la embrion metodele de cercetare ale metabolismului — deci metode care se adresează, din punctul nostru de vedere, etajului morfologic ultrastructural, — „conținutul" celorlalte etaje, — nu putem totuși să depreciem metodele și tehnicile adaptate la studiul etajelor structurale mai „grosolane".

Formele și funcțiile corespunzătoare fiecărui etaj structural reprezintă cîte o calitate morfo-funcțională nouă, rezultatul unui salt în procesul de dezvoltare și, ca atare, o realitate obiectivă, care justifică dezvoltarea și aplicarea metodelor și tehnicilor adecvate.

BIBLIOGRAFIE

1. Frey-Wyssling A., *Submikroskopische Morphologie des Protoplasmas und seiner Derivate*, Protoplasma Monographien, t.XV, Berlin, Bornträger, 1938.

2. Menkes B., *Conceptul lărgit al morfologiei și dialectica formei*, Studii, 1948, nr. 2, p. 50.

3. — *Contribuții la orientarea anatomiei patologice*, Bul. anat. patol., 1955, nr. 1, p. 6.

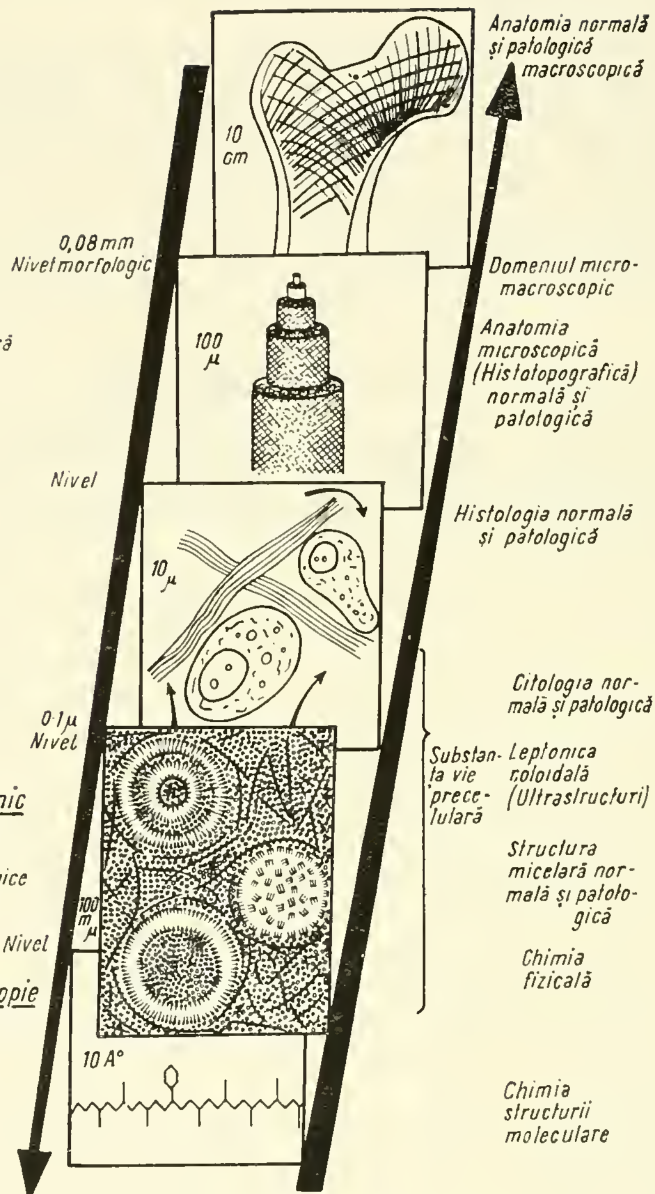


Fig. 92. — Schema etajelor structurale ale organismului.

ANEXA II

METODE HISTOCHIMICE APLICATE ÎN CERCETĂRI ASUPRA EMBRIONULUI DE GĂINĂ

DE

C. RÎMNICEANU

Considerații generale. Studiul glicogenului la embrionul de găină: metoda Sabadaș pentru evidențierea glicogenului; rezultate și discuții. Considerații generale asupra valorii funcționale a prezenței, localizării și intensității enzimelor în general și a fosfatazei alcaline în special. Studiul fosfatazei alcaline la embrionul de găină: metoda Dorfman-Epstein adaptată țesuturilor embrionare; rezultate și discuții

Procesul de dezvoltare a embrionului de găină și anexelor sale, de la începutul incubației și pînă la ecloziune, urmează un ritm rapid și se desfășoară în mai multe etape. Etapele prin care trece complexul embrionar pot fi caracterizate, din punct de vedere morfologic, prin apariția primordiilor de organe, prin creșterea și diferențierea lor pînă la realizarea structurilor pe deplin dezvoltate, prin apariția de noi structuri extraembrionare (de exemplu, alantoida), prin modificarea structurală a unora dintre acestea (de exemplu, corion-alantoida), prin dispariția altora. În toate aceste etape există o continuă interrelație între componenții complexului embrionar.

Apariția structurilor specifice constituie un salt calitativ al procesului de dezvoltare — puncte nodale — de o deosebită importanță în evoluția embrionului. Orice structură nouă, reprezentînd manifestările reactivității la noi condiții, caracteristice fiecărui stadiu din dezvoltarea embrionului, se produce pe baza unui nou tip de metabolism. Modificarea tipului de metabolism stînd la baza procesului de morfogeneză diferențierea biochimică este deci precursorul diferențierii morfologice.

Structura este expresia morfologică a funcției, deci nu putem considera diferențierea unui țesut sau organ decît în relație cu o funcție, fie specifică, fie premergătoare celei specifice, necesară stadiului de dezvoltare în care se găsește organismul respectiv. Așadar, țesuturile și organele în dezvoltare sînt complexe morfo-funcționale care exprimă un anumit tip de metabolism, o anumită diferențiere biochimică.

Reiese clar că în procesul de dezvoltare nu este suficient studiul modificărilor morfologice, ci că este absolut necesar să se ia în considerație legătura dintre procesul de mor-

fogeneză și metabolism, dintre fenomenele biochimice și biofizice și morfogeneză. Este necesar să se cunoască perioada de dezvoltare care precedă modificările vizibile produse în cursul proceselor biologice.

Aceasta implică, pentru morfologi, îmbinarea cercetărilor morfologice cu cele histochimice.

În ceea ce privește biochimia embriologiei puiului de găină, s-au acumulat multe date pînă acum, totuși încă insuficiente. Cercetările de histochimie a embrionului de găină sînt mult mai puține, datorită în mare măsură dificultăților pe care le prezintă încă metodele de histochimie.

Analiza biochimică, care ne dă o imagine a constituției chimice a unui țesut sau organ, un bilanț al diferitelor substanțe chimice, nu reușește însă să precizeze nici existența unor cantități mici din substanța cercetată și nici nu poate aprecia, din punct de vedere chimic, structurile în unitatea lor, în sînul organismului, ea fiind obligată să distrugă chiar complexul molecular, nu numai structurile vizibile.

Histochimia trebuie să completeze aceste goluri, căci ea, deși analizează numai calitativ și nu și cantitativ, permite totuși decelarea unor cantități mici de substanțe chimice, localizarea lor în celulă, legătura lor cu structuratele intracelulare; ea nu poate evidenția o substanță decît legată de structură, identificarea chimică făcîndu-se în sînul țesutului fără a modifica structura lui.

Histochimia urmărește ca atare conservarea substanței pe care o cercetează, respectînd riguros structura țesuturilor. Servind ca o punte de legătură între datele analitice cantitative ale biochimiei și datele morfologice, histochimia tinde să identifice procesele vitale în intimitatea țesuturilor, a structurilor.

La baza activității organismului, a diverselor sale componente deci, stau transformările biochimice, aceste transformări constituind izvorul de energie pentru funcțiile biologice. Veriga principală în procesele energogenetice este metabolismul glucidelor; dar, după cum arată Enghelhardt, „funcția se realizează nu pe seama energiei proceselor de schimb, ci pe seama energiei substanțelor înmagazinate, în calitate de produse ale proceselor metabolice care au concentrat în sine energia acestora". Procesele metabolice pregătesc „substanța explozibilă", spune el, iar pe seama energiei exploziei se realizează funcția. Rezerva de polizaharide constituie deci un izvor de energie de care depind funcțiile oricărui organism; forma de rezervă pentru organismele animale fiind glicogenul-concentrat de energie avînd posibilități largi de transformări fosforate —, el are un deosebit rol în dinamica celulelor și țesuturilor. Cercetarea existenței și repartiției glicogenului va fi prin urmare de o mare importanță în studiul morfo-fiziologiei organismului în dezvoltare.

GLICOGENUL

Împreună cu C. Miclea și M. Drăgan am cercetat histochimic glicogeneza în cursul dezvoltării embrionului de găină, ținînd seama de interrelația organismului în dezvoltare și mediul său extern (substanțele embriotrofice, membranele embrionare, condițiile de existență) începînd cu a treia oră de incubație și pînă la sfîrșitul perioadei embrionare a ontogenezei. Cercetările noastre s-au extins și asupra ouălor fecundate, dar neincubate, iar ca să apreciem în ce măsură fecundația influențează metabolismul glicogenului în ou, am studiat si oul nefecundat.

Datele din literatură asupra glicogenezei în perioada embrionară a ontogenezei puiului de găină sînt contradictorii, și aceasta ține desigur într-o mare măsură de tehnicile folosite de diferiții cercetători. Tehnicile cele mai uzitate, în afară de reacția la iod, care nu permite conservarea preparatelor, sînt în special tehnica lui Best, cu utilizarea de variați fixatori, și tehnica lui Bauer, rezultatele relatate fiind bazate pe aceste tehnici.

Cercetarea histochimică, urmărind localizarea unei substanțe cu respectarea structurii țesutului, deci conservarea ei la locul unde exista pe viu, cere o fixare optimă. Reușita depinde deci în primul rînd de calitatea fixatorului.

Neconcordanța rezultatelor diferiților cercetători se explică prin faptul că glicogenul se găsește în cantități variabile în raport cu fixatorii utilizați. Astfel, fixarea în alcool prezintă cele mai mari inconveniente, căci, avînd o penetrabilitate înceată, el permite degradarea glicogenului. Glicogenoliza poate fi într-o oarecare măsură frînată de fixatorii în care intră acidul picric, care este superior alcoolului prin penetrabilitatea lui mai rapidă. Dar nici acești fixatori nu reușesc să evidențieze decît o parte a glicogenului existent. Bazat pe aceste cunoștințe, în urma experimentărilor îndelungate, Sabadaș a propus folosirea unor fixatori acizi și neutri, alegerea lor fiind în funcție de materialul de cercetat și de problema urmărită. Acești fixatori reușesc să determine — cum se exprimă el — o „stabilizare biologică" a glicogenului, o oprire fizico-chimică a dizolvării lui și în același timp păstrarea histologică a țesuturilor. „Stabilizarea biologică" este realizată prin inhibarea acțiunii fermentative, și această frînare a glicogenolizei se înfăptuiește printr-o înaltă concentrație de ioni de cupru, calciu, zinc sau fluorizină și printr-o reacție slab acidă a soluțiilor fixatoare. Solventul este alcoolul etilic, care în amestecuri ajunge la concentrația de 70—80°, așa că, excluzînd apa ca dizolvant și limitînd cantitatea de apă, elimină și posibilitatea de umflare și de hidroliză.

Pentru evidențierea glicogenului, Sabadaș utilizează reactivul Schiff, după ce în prealabil a realizat grupări aldehidice libere în glicogen, prin folosirea periodatului de sodiu sau potasiu.

La începutul cercetărilor noastre, noi am folosit aceleași tehnici ca și autorii care s-au ocupat cu problema glicogenezei la embrionul de găină, fără să ajungem la rezultate concordante și concludente. Ulterior, experimentînd — în paralel — metoda Sabadaș, am constatat că aceasta este o metodă electivă, care prezintă toate condițiile pentru a păstra integritatea moleculei de glicogen.

Metoda Sabadaș adaptată de noi la studiul glicogenezei embrionului de găină. Pentru țesuturile embrionare, după cum arată și Sabadaș, se preferă fixatorii neutri.

Noi am folosit următorul fixator:

Alcool 96°	100 ml
Azotat de cupru	1,8 g
Azotat de calciu	0,9 g
Formalină 40%	10 ml

Formalina se adaugă înaintea întrebuințării.

Durata fixării a fost între 30 de minute și 2 ore, în raport cu vîrsta embrionului. Embrionii au fost fixați vii. Prelungirea duratei fixării chiar pînă la 24 de ore pentru embrionii mari nu prezintă nici un inconvenient. După fixare, embrionii au fost trecuți în mai multe alcooluri de 96°, trecerile prin alcooluri durînd între cîteva ore și 24 de ore. Incluzia s-a făcut la parafină.

Lipirea secțiunilor pe lame s-a făcut cu alcool de 30°.

Oxidarea preparatelor deparafinate s-a făcut cu periodat de sodiu M/100, la temperatura camerei, timp de 5 minute.

Spălarea, de două ori în apă distilată, cîte 3 minute.

Trecerea la apă sulfuroasă, de trei ori, cîte 3 minute.

Realizarea reacției de culoare a glicogenului prin reactivul Schiff, timp de 15 minute. Prezența glicogenului : culoarea roșie-violacee.

Spălarea în apă sulfuroasă, de trei ori, cîte 3 minute.

Spălarea în apă distilată de trei ori.

Colorarea nucleilor cu hematoxilină Meyer.

Controlul glicogenului s-a făcut regulat prin trecerea preparatelor, înainte de oxidare, la amilază, la 37°, timp de 15 minute.

În studiul glicogenezei am luat ca punct de plecare vitelusul, care, după cum arată acad. V. Mîrza, reprezintă expresia asimilării mediului extern de către organismul matern. De aceea, cercetările noastre s-au îndreptat inițial asupra studiului ouălor nefecundate ; metoda Sabadaș nu evidențiază prezența de glicogen la acestea, nici în membrana vitelină și nici în globulele de vitelus.

În condițiile schimbate de mediu, la oul fecundat, dar neincubat, am constatat existența glicogenului — cu aspect omogen în membrana vitelină de la nivelul discului embrionar ; în rest, reacția este negativă, ca și globulele de vitelus.

La embrionul în dezvoltare, privit în unitatea lui și în interdependență cu mediul înconjurător (vitelus, membrana vitelină, aria vasculară) se observă chiar din a treia oră de incubație că membrana vitelină arată în totalitatea ei un conținut bogat în glicogen (fig. 93), cu același aspect omogen, care se menține pînă în ziua a cincea de incubație, cînd membrana începe să se subțieze, arătînd și un conținut mai sărac de glicogen. Tot de la a treia oră de incubație se remarcă prezența glicogenului și în globulele de vitelus alb ; numărul acestor globule purtătoare de glicogen crește, atingînd un maximum la 24 de ore de incubație, mai ales în cavitatea subgerminală, dar pierzînd treptat, cu vîrsta, acest conținut.

Este de remarcat că atît în membrana vitelină, cît și în globulele de vitelus alb, culoarea glicogenului dată de reactivul Schiff este de o nuanță ușor diferită de aceea a glicogenului din ficat, inimă, mușchi ș.a. Totuși este vorba de glicogen, căci preparatele de control, cu ajutorul fermenților, ne-au dovedit-o. Probabil că în acest caz e vorba de un glicogen cu o altă structură. După cum au arătat unii cercetători (B. N. Stepanenko, A. M. Petrova și E. I. Rosenfeld), care au studiat glicogenul *in vitro*, există diferite tipuri de glicogen, intensitatea colorației fiind în legătură cu structura glicogenului respectiv.

Membrana vitelină prezintă o deosebită importanță în primele stadii de dezvoltare embrionară. Ea constituie un organ de acumulare, nu numai de glicogen, dar și de fosfatază alcalină și de acizi nucleici, așa cum am constatat în cercetările noastre făcute în colaborare cu acad. V. D. Mîrza. Acumularea glicogenului în membrana vitelină este determinată de prezența discului embrionar, glicogenul lipsind la ouăle nefecundate, iar cea mai mare cantitatea de glicogen existînd la nivelul discului embrionar. Potențialitățile membranei viteline, de a acumula acizi nucleici, enzime, glicogen, îi conferă rolul unui organ intermediar între albuș, vitelus și embrion.

O dată cu vascularizația embrionului, glicogenul se depozitează și în elementele ariei vasculare, sub formă de fine granule, a căror bogăție crește pînă spre ziua a șaptea de incubație ; apoi scade treptat.

În celulele ecto-și endodermice, glicogenul apare la 24 de ore de incubație.

Contrar vechii concepții asupra „ficatului tranzitoriu", socotim că trebuie să includem în acest termen nu numai celulele blastodermice, ci și membrana vitelină, vitelusul alb și elementele ariei vasculare. Către a cincea — a șasea zi de incubație, membrana vitelină se subțiază, pierzînd rolul de rezervor de glicogen, și de aici înainte, după constatările noastre, ficatul embrionar preia funcția glicogenetică.

O dată cu apariția inimii apare glicogen și în mioblaștii ei, cantitatea granulelor crescînd cu vîrsta.

Chiar din ziua a treia de incubație, în unii mioblaști, detașați din miotomi, apar puține granule fine de glicogen, pentru ca la vîrsta de 5 zile, atît musculatura dorsală, cît și cea cervicală, bine dezvoltate, să conțină o importantă cantitate (fig. 94). Prezența glicogenului precedă mișcările embrionului. Cercetările lui V o l o h o v arată că din ziua a șaptea apar, la embrionul de găină, primele mișcări active spontane.

În sistemul nervos, la toți embrionii studiați de noi, n-am găsit glicogen — în afară de sinusul romboidal (corpul glicogenic) — decît în substanța albă din regiunea ventrală a măduvei și a măduvei prelungite (fig. 94) și în unele celule simpatice, îndeosebi acelea care au migrat spre teritoriul glandei suprarenale și gonadei (fig. 95). Apariția glicogenului, în aceste formațiuni, este timpurie, din a cincea zi de incubație, aceste stricte localizări menținîndu-se în tot timpul dezvoltării. Ce semnificație are prezența acestui glicogen numai în anumiți neuroni? Cercetările făcute în filogeneză de o serie de autori au dovedit că sinteza polizaharidului este proprie neuronului, ca aparținînd animalelor de pe treptele inferioare (de pildă melci, lipitori). La animalele superioare există o diferență în sintetizarea glicogenului față de nevertebrate și vertebratele inferioare. La început, în filogeneză, se găsește glicogen, atît în corpul celular, cît și în prelungiri; apoi, în procesul de evoluție, numai unii neuroni sau numai porțiuni ale lor vor prezenta această putere de sinteză. Reiese deci că, în perfecționarea adaptării organismelor la condițiile de mediu, scăderea puterii glicogenetice este un factor deosebit de important în biodinamica neuronilor (Sabadaș).

Pe de altă parte, o serie de cercetători au arătat că sinteza mediatorilor este strîns legată de metabolismul glucidic al celulelor nervoase. Astfel, K o ș t o i a n ț a demonstrat experimental participarea metabolismului glucidic în sinteza mediatorilor. După alții (W e l s h, H y d e, N a c h m a n s o n, H o f f ș. a.), conținutul în glicogen al neuronilor creează premisa pentru formarea acetilcolinei. Constatarea însă a participării diferite a neuronilor în sinteza glicogenului pune problema unor particularități biologice ale diferitelor categorii de neuroni (Sabadaș). Acest autor, cercetînd glicogenul în sistemul nervos la mamifere, ajunge la concluzia că înmagazinarea de glicogen se face în relație cu corpii tigroizi. El a observat că glicogenul lipsește în axon și la nivelul conului de emergență, deci lipsește acolo unde nu există substanță cromidială. Pe de altă parte, el consideră că substanța tigroidă se deosebește din punct de vedere chimic, la diferitele categorii de neuroni. Împreună cu C. M i c l e a, studiind corpii tigroizi ai neuronilor embrionului de găină, am constatat că în ziua a cincea de incubație ei apar numai în celulele ganglionilor simpatici și în celulele din hipotalamus, fapt care concordă cu observația apariției glicogenului la aceeași vîrstă, în aceiași neuroni.

În etajele superioare ale sistemului nervos n-am reușit să punem în evidență prezența glicogenului la nici o vîrstă, în perioada embrionară a ontogenezei. Acad. P a l l a d i n a stabilit prezența glicogenului în țesutul cerebral — pe cale analitică — și a arătat, împreună cu H a i k i n a, că glicogenul este o substanță supusă unei necontenite transformări. Desfășurarea rapidă a metabolismului glicogenului intracerebral explică probabil

faptul că în condiții normale acesta nu reușește să se acumuleze în celulele nervoase din creier. Tot el a demonstrat prezența în țesutul cerebral a unor fermenți care sintetizează și scindează glicogenul. După cum vom arăta mai departe, în cercetările noastre făcute asupra localizării fosfatazei alcaline și a intensității reacției, împreună cu C. M i c l e a și M. D r ă g a n, am constatat histochimic că această fosfatază este constant prezentă în creier chiar din stadii timpurii ale dezvoltării embrionului de găină, indicînd o activitate metabolică foarte ridicată. Dar fosfataza alcalină n-a fost în nici un stadiu prezentă în scoarța creierului.

Pe baza acestor date putem spune, că încă din perioada embrionară, chiar din stadiile timpurii (5 zile de incubație) se poate constata pe de o parte, diferențierea tipurilor de neuroni pe bază de histochimie, iar pe de altă parte, că înlocuirea capacității de înmagazinare a glicogenului cu utilizarea directă a glucozei a determinat intensificarea funcției etajului superior al sistemului nervos central.

Tot din a cincea zi de incubație se observă prezența de glicogen în celulele cartilaginoase, sinteza polizaharidului precedînd procesele de osificare. De asemenea, în celulele tubilor contorți ai mezonefrosului se constată, tot de la această dată a dezvoltării embrionare, prezența unor granule de glicogen în porțiunea apicală a celulelor, concentrat în marginea în perie. Cercetările noastre (B. M e n k e s, C. R î m n i c e a n u și C. M i c l e a) asupra funcțiilor rinichiului embrionar, ne-au dovedit că sinteza glicogenului în celulele tubilor contorți ai rinichiului embrionar reprezintă într-adevăr un material „explozibil", căci din a șasea zi de incubație am constatat prezența funcției de sinteză și eliminare a acidului uric și debutul capacității de acumulare a albastrului de tripan. De asemenea, și în metanefros funcțiile cercetate de noi au fost precedate de funcția de sinteză a glicogenului.

De remarcat că în musculatura netedă tînără a tubului digestiv, glicogenul apare de timpuriu și se menține, pe cînd în celulele epiteliale ale mucoasei tubului digestiv glicogenul cu apariție timpurie constituie o rezervă tranzitorie, de scurtă durată.

În ceea ce privește apariția primelor semne funcționale de glicogeneză hepatică la embrionul de găină, datele din literatură sînt din cele mai discordante, diferiții cercetători utilizînd variate tehnici, cu fixatori diferiți, dar care nu îndeplinesc cerințele unei fixări adecvate. Astfel, unii consideră că funcția glicogenetică a ficatului embrionar se manifestă în a doua jumătate a dezvoltării (C l. B e r n a r d, J o r d a n, A r o n și P o t v i n, prin cercetări histochimice, iar N e e d h a m prin cercetări analitice); alții plasează debutul acestei funcții la începutul celei de-a doua săptămîni a dezvoltării embrionare (G i l l, N o r d m a n), iar alții, mai devreme, începînd cu ziua a șasea de incubație (D a l t o n).

Noi am constatat că manifestarea funcției glicogenetice a ficatului embrionului de găină Leghorn alb este în strînsă legătură cu condițiile de existență ale organismului matern, fapt care, probabil, nu a fost luat în considerare de cercetătorii anteriori, și astfel se explică diversitatea datelor. În cercetările noastre pe embrioni din diferite anotimpuri am observat că la embrionii din lunile de vară funcția glicogenetică apare din a șasea zi de incubație (fig. 96) și cantitatea de glicogen este mai mare decît la embrionii din lunile de primăvară, cînd în ziua a șaptea de incubație apar cantități abia decelabile, iar în lunile de iarnă, abia în ziua a noua de incubație se observă sinteza de glicogen, este drept, în cantități apreciabile. Indiferent de anotimp, trebuie să arătăm că, prin metoda Sabadaș, la 9 zile de incubație, se observă cantități importante de glicogen. Cantitatea de glicogen hepatic crește, atingînd un maximum între a 10-a și a 11-a zi (fig. 97) de incubație, apoi

scade, atingînd un minimum impresionant în ziua a 13-a de incubație (fig. 98), crește brusc în ziua a 14-a și arată din nou o scădere mare în ziua a 19-a.

Rezultatele noastre concordă cu rezultatele histochimice ale lui D a l t o n în ceea ce privește apariția glicogenului în celula hepatică embrionară și cu rezultatele microanalitice ale lui L e i b s o n în ceea ce privește variațiile glicogenului în cursul ontogenezei embrionului de găină Leghorn alb.

Prezența glicogenului în celulele ficatului embrionar la 6 zile incubație în cantități apreciabile (în lunile de vară) coincide cu trecerea ficatului la structura în cordoane, structură care se schițează de altfel din a cincea zi de incubație, dată la care se evidențiază în unele celule hepatice un condriom cu aspect de filamente și grăunțe, așa cum am relatat în cercetările asupra condriomului hepatic, împreună cu C. M i c l e a, L. C o v a c i u și C. D i n c ă. Cu toate că noi n-am putut evidenția prezența glicogenului la această dată, putem socoti că unele celule au această activitate, redusă însă, cantitatea de glicogen neputînd fi decelată nici cu metoda Sabadaș. Experiențele noastre cu insulină și cu extract de pancreas embrionar (de 12 zile incubație) care au determinat apariția unei cantități mari de glicogen în ficatul embrionilor de 5 zile incubație (fig. 99) dovedesc că la această vîrstă celula hepatică este capabilă de glicogeneză, cu toate că aspectul morfologic nu arată încă o structură general matură.

Variațiile în capacitatea de sintetizare a glicogenului, de către celula hepatică, începînd cu ziua a zecea de incubație, ne arată desigur intervenția altor factori. Între ziua a 10-a și a 11-a de incubație (vîrf al glicogenezei), hipofiza arată o diferențiere morfologică (așa cum vom preciza ulterior). Ziua a 12-a —a 13-a de incubație, cînd glicogenul este scăzut și aproape dispărut din ficat, coincide cu trecerea tiroidei de la o structură în cordoane la structura în foliculi, dar prezentînd încă multe cordoane. Foliculii sînt unii mai mari și plini cu coloid, alții mici, alții pe cale de formare. În acest moment, în celulele tiroidiene, cît și în coloid, se găsește o importantă înmagazinare de glicogen. Din a 14-a zi, creșterea, glicogenezei hepatice continuă pînă în ziua a 19-a de incubație, cînd embrionul consumă prin desfacerea glicogenului, energia necesară pregătirii eclozinnii.

Ne-am pus problema rolului jucat de sistemul nervos în reglarea metabolismului glucidic hepatic în perioada embrionară a ontogenezei, și în acest sens am cercetat împreună cu C. M i c l e a și M. D r ă g a n acțiunea unor substanțe al căror efect asupra sistemului nervos central și a segmentului său simpatic este în mare măsură cunoscut în perioada postembrionară. Am experimentat cu morfină, luminal sodic și adrenalină, toate trei substanțe cu acțiune hiperglicemiantă. Pornind de la premisa că orice influență exercitată asupra funcției unui țesut determină modificarea chimismului, că orice modificare a proceselor metabolice din țesuturi determină și modificarea excitabilității țesuturilor, noi am urmărit acțiunea acestor trei substanțe asupra metabolismului glicogenului în ficatul embrionului de găină Leghorn alb, începînd cu a șasea zi de incubație și pînă la sfîrșitul dezvoltării. I. P. P a v l o v a corelat procesul de excitație cu consumul de substanțe energetice, iar procesul de inhibiție cu intensitatea procesului de sinteză. În experiențele noastre am constatat că morfina se comportă ca un factor anabolizant al metabolismului glucidic începînd cu a 11-a zi de incubație; morfina are o acțiune inhibitoare redusă în prima perioadă, și foarte accentuată în a doua perioadă a dezvoltării embrionare (fig.100). Luminalul acționează ca un factor catabolizant pînă în a 13-a zi de incubație, iar de la această dată ca factor anabolizant, ca și morfina. Adrenalina prezintă o acțiune catabolizantă ca și luminalul, în prima perioadă, iar de la a 13-a zi de incubație se comportă ca un anabolizant, identic cu morfina, luminalul sodic. Comportarea diferită a

metabolismului glicogenului celulei hepatice în prima perioadă și în a doua perioadă ne face să credem că în prima perioadă modificările metabolismului sînt expresia unei acțiuni directe a acestor substanțe asupra celulei hepatice, iar în a doua perioadă, aceste modificări metabolice sînt sub dependența sistemului nervos; în această perioadă, cele trei substanțe acționează identic, mărind glicogeneza hepatică. În sprijinul acestei ipoteze vin rezultatele cercetărilor noastre (B. Menkes, C. Rîmniceanu și C. Miclea). Distrugeri experimentale ale diferitelor porțiuni ale sistemului nervos la embrionul de găină la diferite vîrste, au arătat că leziunile produse la nivelul sistemului nervos central au numai după 11 zile de incubație drept consecință modificări funcționale, de la această dată integritatea sistemului nervos fiind indispensabilă unei funcționări normale.

FOSFATAZA ALCALINĂ

Cercetarea activității unei enzime reprezintă un mijloc deosebit de important pentru aprecierea activității funcționale a țesuturilor și organelor de dezvoltare.

Orice enzimă este adaptată unui substrat; deci, în cursul dezvoltării embrionare, apariția unei enzime indică apariția unui substrat care n-a existat încă în etapele premergătoare. Substratul nou implică însă și prezența de noi funcții. Sinteza enzimei determinată de apariția noului substrat devine la rîndul său baza viitoarei diferențieri morfo-funcționale. După unii cercetători, repartiția enzimelor, cît și cantitățile diferite ale substanțelor care acționează ca substrat ar sta la baza specificității organelor (Ten Cate). Astfel, Moog (1947), cercetînd activitatea apirazei în dezvoltarea embrionului de găină, a remarcat schimbări bruște ale activității enzimei corelate cu fazele distincte ale maturării organelor (inimă, mușchi scheletali, creier, ș.a.). Același autor (1950—1951) a mai arătat, tot la embrionul de găină, că fosfataza alcalină este sintetizată în cantități mai mari în timpul perioadei de diferențiere morfo-funcțională, apariția ei în intestin (duoden) fiind dovada maturității funcționale.

Schmerling (1947) a constatat la șobolani ca transaminaza apare în diferite zone și apariția ei coincide cu un moment important al dezvoltării structurii și funcției țesutului respectiv. De asemenea, Nachmanson observă creșterea colinesterazei în mușchii embrionului de găină între a șasea și a șaptea zi a incubației, cînd apar primele semne de motilitate. Boell (1948) a demonstrat că există „un paralelism între sinteza unei enzime și creșterea gradată a funcției diferitelor segmente ale sistemului nervos central (de exemplu fibrele optice prin eliberare de acetilcolină)". Nachmanson și Wilson (1951) constată la embrionul de găină că sinteza colinesterazei este asociată cu activitatea funcțională a sistemului nervos central, iar substratul său — acetilcolina — crește, după Needham (1942), între 2½ la 5 zile incubație.

Cercetarea activității enzimatice *in vitro* nu poate să dea însă date strict comparabile cu activitatea enzimelor în organismul viu, în care acestea sînt supuse pe de o parte acțiunii excitante sau inhibitoare a diferiților factori, iar pe de altă parte,enzimele fiind în genere fixate pe structuri celulare, extracția lor completă necesită și distrugerea structurilor pentru a elibera enzima respectivă.

Cercetările de histochimie ne pot pune în condiții mult mai apropiate de cele din organismul viu, cu condiția însă de a împiedica difuzarea enzimelor. Trebuie să recunoaștem însă că, în prezent, metodele histochimice de decelare a enzimelor nu reușesc să ne dea *in toto* rezultate satisfăcătoare. Nu avem, de altfel, nici posibilitatea de a studia la embrion — cu metodele actuale — decît un număr restrîns de enzime.

Dintre enzimele cu rol biologic deosebit de important sînt și fosfatazele. Ele au acțiune hidrolizantă, catalizînd hidroliza și sinteza multiplelor combinații ale acidului ortofosforic și pirofosforic ; aceste reacții sînt etapele metabolismului glucidic și lipidic (J. Roche, Courtois). Participînd la procesele de fosforilare, de transesterificare și hidrolizare a esterilor acidului fosforic, rolul lor în organism apare deosebit de important (Palladin) De exemplu, reabsorbiția glucozei în rinichi comportă un ciclu de fosforilare și defosforilare (Lundsgaard).

Rolul lor biologic, după cum arată J. Roche, „este legat nu numai de activitatea lor, ci și de condițiile fiziologice în care ele își exercită activitatea". După cum arată acest cercetător, localizarea lor histologică a dat indicații foarte utile asupra funcțiilor lor.

Celulele conțin mai multe fosfataze, cu caractere diferite, care acționează la pH-uri optime variabile. Fosfataza alcalină, al cărei pH optim este între 8,8 și 9,4, este caracteristică țesuturilor animale, lipsind însă în cele vegetale. Fosfatazele alcaline sînt metaloproteine care conțin magneziu ; în unele cazuri, însă, acest metal poate fi înlocuit cu zinc. Este o enzimă cu metal disociabil.

Diferiți cercetători au arătat rolul fosfatazei alcaline în diferențierea celulară (Moog) în sinteza proteinelor, în geneza acizilor nucleici (Kaspersson), în procesele de sinteză și hidroliză, în procesele de secreție. Toate acestea ne-au determinat să cercetăm activitatea fosfatazei alcaline în cursul dezvoltării embrionului de găină, urmărind apariția, localizarea și variațiile intensității reacției, atît în corpul embrionului, cît și în vitelus, membrana vitelină, aria vasculară, membrana corion-alantoidă.

Împreună cu acad. V. Mîrza, C. Miclea, M. Drăgan, B. Litvac, am cercetat fosfataza alcalină în complexul embrionar începînd cu vîrsta de 3 ore incubație. În continuarea acestor cercetări, împreună cu C. Miclea și M. Drăgan, am studiat embrionul de găină și anexele lui pînă la ecloziune.

Metoda folosită de noi a fost metoda Dorfman - Epstein, care este o modificare a metodei Gömöri și pe care am adaptat-o la studiul embrionului de găină.

Am folosit această metodă pentru unele avantaje pe care le prezintă, concluzie la care am ajuns după ce în prealabil am lucrat cu metoda Gömöri. Prin metoda Dorfman-Epstein regiunile care conțin fosfatază alcalină se colorează în albastru. Citoplasma se colorează cu eozină, ceea ce prezintă un dublu avantaj : colorarea de contrast — care dă o apreciere mai justă a localizării și intensității activității enzimatice — iar pe de altă parte, acolo unde colorația slabă albastră-azurie, nespecifică fosfatazei, ar putea să inducă în eroare, ea dispare prin eozină.

Modificarea adusă metodei Gömöri de către Dorfman - Epstein constă în înlocuirea sărurilor de cobalt prin săruri de fier, care sînt ulterior ușor detectate.

Dorfman - Epstein fixează fragmentul de țesut de 3—4 mm la rece timp de 12 ore în alcool de 80°, incluzionează la parafină și secțiunile (7μ) se trec în soluția de incubație timp de 24 de ore la 37° ; soluția de incubație este amestecul Gömöri cu pH între 9 și 9,4. Concomitent se fac secțiuni de control, care sînt incubate într-un amestec analog, dar lipsit de glicerofosfat de sodiu.

Secțiunile de experiență și control se spală cu o soluție de azotat de calciu 0,5%, apoi sînt tratate 5 minute cu o soluție de sulfat feros 2%. Urmează spălarea minuțioasă cu apă (de trei ori) și tratarea timp de 1 minut cu o soluție de fericianură de potasiu acidulată cu un volum egal de acid clorhidric 0,1%. Secțiunile sînt spălate apoi cu apă distilată deshidratate, clarificate și montate în mod obișnuit.

Noi am adaptat această tehnică la studiul complexului embrionar. Embrionii au fost fixați vii în alcool de 80° în prealabil răcit la 4°; durata fixării a variat în raport cu vîrsta embrionului, între ½ oră și 8 ore. Incluzia la parafină a fost foarte rapidă (maximum 2 ore).

Secțiunile lipite pe lamă cu alcool de 40% au fost uscate rapid pentru a evita contactul prelungit cu apa.

Incubația în substratul mediu a variat ca timp între o oră și jumătate pînă la cinci ore și jumătate.

Cu această metodă, prezența fosfatazei alcaline este indicată de o colorație albastră. Variația de intensitate a colorației albastre a fost corelată cu variația de intensitate a activității fosfatazei alcaline. Variația de intensitate a activității enzimei este, după constatările noastre, în funcție și de localizarea ei în celulă. Astfel, nucleul albastru palid indică pentru noi o activitate fosfatazică slabă, culoarea albastră intens la nivelul nucleului ne indică o activitate morfogenetică, pe cînd culoarea albastră intens a nucleului și a citoplasmei sau numai a citoplasmei exprimă activitatea funcțională specifică a celulei. Moog și Brachet (1944–1946) consideră și ei două stadii în activitatea fosfatazei alcaline. La început, activitatea enzimei indică proliferarea și diferențierea celulară, și fosfataza este localizată numai în nucleu, iar în al doilea stadiu, fosfataza localizată în citoplasmă indică perioada de activitate funcțională specifică a celulei. Steger (1953) consideră că în celulă există două fosfataze alcaline diferite, una localizată în nucleu, alta în citoplasmă, avînd și funcții diferite.

Ca și pentru glicogen, noi am cercetat activitatea fosfatazei alcaline începînd cu oul nefecundat. Se știe că în vitelus există un bogat conținut în fermenți, alături de hormoni și vitamine, constituind sistemul ergonic al vitelusului (C. I. Parhon). În ouăle nefecundate n-am putut decela histochimic prezența fosfatazei alcaline. Ea apare, ca și glicogenul, atît în membrana vitelină, cît și în vitelus, numai în ouăle fecundate, la nivelul discului embrionar. Este știut că activarea sau inhibarea fermenților este determinată de condițiile de mediu, extern și intern. Fecundația, în cazul fosfatazei alcaline, schimbînd condițiile de mediu în ou, a activat această enzimă, care a putut fi astfel evidențiată. O dată cu incubația, chiar din primele ore (fig. 101) se intensifică reacția fosfatazei alcaline și cuprinde teritorii tot mai mari de vitelus alb și primordial.

În corpul embrionului, fosfataza alcalină apare pentru prima dată la nivelul tubului neural și în tot timpul dezvoltării embrionare este prezentă în sistemul nervos central, în care apare succesiv în diferitele etaje (fig. 102). Apariția fosfatazei alcaline în diencefal este precoce, la 48 de ore, apoi se extinde și se intensifică în raport cu dezvoltarea embrionului, cuprinzînd succesiv lobii optici, bulbul, cerebelul (fig. 103). De-a lungul măduvei spinării, în ganglionii rahidieni și în nervii cerebro-spinali, localizarea și intensitatea reacției fosfatazei alcaline sînt într-o continuă schimbare, contrastînd cu localizările din etajele superioare, unde, o dată apărută, enzima se menține și se intensifică cu înaintarea în vîrstă. Se observă o interrelație între segmentele măduvei, ganglionii, nervii și organele corespunzătoare inervate de segmentul respectiv, care arată în același timp o reacție negativă sau pozitivă mai mult sau mai puțin intensă (fig. 104).

După modul cum apare și cum se intensifică activitatea fosfatazei alcaline în sistemul nervos, am putea deduce intrarea succesivă în funcțiune a diferitelor segmente. Faptul că acest ferment se localizează activ întîi în diencefal — porțiune din trunchiul nervos care, fiind mai veche decît scoarța, intră mai înainte în funcțiune decît scoarța — poate să ne servească drept indicator funcțional. Rolul fermenților ca indicatori funcționali a fost

arătat și de Gh. Marinescu, care a stabilit importanța oxidazelor în procesul de regenerare a nervilor.

Corelația dintre dezvoltarea morfologică a sistemului nervos și formarea sistemelor enzimatice a fost arătată de Kreps prin studiul unor enzime din creierul unor păsări și mamifere. De asemenea, același cercetător a arătat și existența unor corelații între dezvoltarea funcțională și cea biochimică a sistemului nervos.

Din datele filogenetice și din cele biochimice din lucrările lui Kreps se deduce că diferitele segmente ale sistemului nervos nu evoluează și nu intră în funcțiune în același timp. Scoarța apare pentru prima dată la păsări. Deci, la păsări, scoarța este regiunea cea mai tînără a sistemului nervos și rămîne slab dezvoltată și la adult. Activitatea nervoasă cea mai susținută revine etajelor inferioare ale sistemului nervos, începînd cu diencefalul. Rezultatele noastre asupra apariției și localizării fosfatazei alcaline concordă cu constatările de mai sus.

În ficat, fosfataza alcalină este prezentă chiar din ziua a cincea de incubație, apărînd mai întîi în celulele din vecinătatea vaselor; din ziua a șasea de incubație, reacția fosfatazei alcaline ocupă regiuni tot mai largi și prezintă o intensitate tot mai mare, care interesează atît nucleul, cît și citoplasma celulelor hepatice. Reacția de intensitate maximă, care ocupă teritorii largi, se constată la 10—11 zile de incubație (fig. 105) și între 15 și 18 zile de incubație. Se remarcă o scădere a intensității și o limitare a acțiunii fosfatazice în zilele a 13-a și a 19-a de incubație (fig. 106), date care corespund zilelor în care se înregistrează un maximum în conținutul de glicogen (10—11 zile) și un minimum (13 și 19 zile).

Atît topografia, cît și intensitatea reacției enzimei sînt în continuă schimbare în ficat, fapt pe care l-am menționat și în privința glicogenului. Relația aceasta topografică, care indică participarea fosfatazei alcaline la metabolismul glucidic, a fost de altfel observată și de Wislocki și Dempsey în celulele din placenta maternă și fetală de la diferite specii de animale. Totuși, fosfataza alcalină precedă funcția glicogenetică evidentă a celulelor hepatice embrionare.

Împreună cu C. Miclea și M. Drăgan am cercetat modificările reacției fosfatazei alcaline la nivelul ficatului embrionar sub influența unor substanțe a căror acțiune asupra metabolismului glucidic am urmărit-o în cercetări prealabile în diferitele etape ale dezvoltării puiului de găină. Lucrînd cu morfină, luminal sodic și adrenalină pe embrioni de găină Leghorn alb, am constatat că sub acțiunea morfinei reacția fosfatazei alcaline nu este modificată în prima perioadă a dezvoltării embrionare, dar după a 12-a zi de incubație reacția se intensifică; sub acțiunea luminalului și a adrenalinei, reacția fosfatazei alcaline este mult scăzută pînă în ziua a 13-a de incubație, după care ele se comportă la fel cu morfina. Corelînd aceste rezultate cu cele obținute cu aceleași substanțe asupra variațiilor glicogenului hepatic, observăm un paralelism între manifestările reacției fosfatazei alcaline și ale glicogenului.

Glandele endocrine arată o reacție pozitivă medie din a șaptea zi de incubație.

Hipofiza prezintă în ziua a șaptea de incubație o reacție pozitivă medie, care se intensifică între ziua a noua și a zecea, cînd începe să se observe o diferențiere a celulelor sale în trei tipuri, după gradul de intensitate a reacției: celule intens pozitive (nucleu și citoplasmă), celule cu reacție pozitivă medie (nucleu) și celule negative (fig. 107). Ulterior, reacția intensă cuprinde un număr din ce în ce mai mare de celule. Cercetările acad. C. I. Parhon și colaboratori au dovedit că hipofiza de pui are activitate tireotropă în a zecea zi a incubației. Cercetările noastre arată o corelație funcțională între sinteza enzimei și funcția hipofizei.

Epifiza, după a noua zi de incubație, are o reacție slab pozitivă, pentru ca în a 11-a zi de incubație să capete un aspect morfologic asemănător glandei mature, iar reacția fosfatazei alcaline să devină intens pozitivă. Putem considera că epifiza este morfo-funcțional diferențiată din a 11-a zi de incubație.

Tiroida prezintă, începînd cu ziua a șaptea de incubație unii nuclei cu reacție slab pozitivă ; din ziua a zecea de incubație, ea arată, pe lîngă dispoziția în cordoane (în care celulele au o reacție pozitivă medie sau negativă), și o dispoziție a unor celule în cuiburi, în care reacția este intens pozitivă. Din ziua a 11-a de incubație încep să apară primii foliculi tiroidieni, care în ziua a 12-a prezintă diferite mărimi și aspecte funcționale, cu coloid în cantități variabile (fig. 108 și 109). Reacția fosfatazei alcaline este intens pozitivă la nivelul foliculilor, iar în celulele cordoanelor restante este negativă sau slab pozitivă. Intensitatea reacției crește în raport cu creșterea numărului și a volumului foliculilor. Luînd ca test funcțional localizarea fosfatazei alcaline, putem spune că activitatea funcțională a tiroidei începe după ziua a zecea de incubație, cînd coexistă cordoane și foliculi. Datele noastre concordă cu acelea date de B l a n q u e t, S t o l l și C a p o t, care demonstrează prin iodul marcat că din ziua a zecea de incubație tiroida este capabilă de a capta iodul. După S t u d i ț k i, tiroida embrionului de pasăre este pregătită pentru perceperea tireotropului, deci capabilă de funcționare, încă din ziua a opta de incubație, deci înainte de perioada morfologică matură. Noi am constatat la această vîrstă o reacție slab pozitivă la nivelul nucleilor.

Paratiroidele arată o reacție slab pozitivă a fosfatazei alcaline la 7 zile incubație, care devine pozitivă între ziua noua și a zecea și variază puțin ca intensitate în zilele următoare (fig. 108).

Suprarenala prezintă încă de la vîrsta de 5 zile incubație o dispoziție a celulelor sale în cordoane, însă cu reacția fosfatazică negativă. La periferia glandei încep să se așeze celulele nervoase simpatice migrate, care prezintă o reacție pozitivă. Începînd din ziua a șaptea de incubație, celulele acestea nervoase pătrund în număr redus printre celulele cordoanelor, cele mai multe menținîndu-se la periferia glandei (fig. 110). Celulele din cordoane rămîn însă negative pînă în ziua a noua — a zecea, cînd apare o reacție medie persistentă în tot timpul embriogenezei. Reacția pozitivă în celulele nervoase simpatice după ziua a cincea de incubație ne face să considerăm că aceste celule prezintă o secreție specifică încă de la această dată, fapt care concordă cu cercetările lui A. B. D a w s o n, care prin impregnări argentice a pus în evidență reacția cromafină a acestor celule în ziua a șasea de incubație, în complexul suprarenal. S a c h s ș.a. au arătat că adrenalina apare în corpul embrionului de găină din ziua a opta de incubație.

Asupra funcției corticalei, reacția fosfatazei alcaline fiind pozitivă numai după a zecea zi de incubație, dar prezentînd o reacție medie în tot timpul dezvoltării embrionare pînă la ecloziune, nu putem atribui acestor cordoane în perioada embrionară a ontogenezei decît o potențialitate funcțională, deși A. B. D a w s o n a constatat apariția acidului ascorbic în celulele cordoanelor din a 11-a a 12-a zi de incubație.

Pancreasul prezintă încă de la vîrsta de 5 zile incubație numeroase elemente nervoase, celule nervoase izolate și în grămezi, precum și fibre nervoase dispuse printre acini. Semnele unei maturări morfologice a pancreasului endocrin apar însă abia după a 14-a zi de incubație, o dată cu formarea insulelor Langerhans. La nivelul insulelor Laguesse, reacția fosfatazei alcaline este pozitivă (medie), ceea ce pledează pentru o funcție specifică încă în stadiu de insule Laguesse. Pentru a verifica acest lucru, am cercetat împreună cu C. M i c l e a și M. D r ă g a n pancreasul endocrin embrionar în legătură cu funcția

glicogenetică a ficatului embrionar. Prin extracte de pancreas embrionar de 12 zile incubație am observat că încă de la această vîrstă pancreasul, deși nu are încă diferențiate insulele Langerhans, acționează determinînd o activitate glicogenetică a celulelor ficatului embrionar de 5 zile incubație.

Timusul are o reacție slab pozitivă sau medie abia către sfîrșitul perioadei de dezvoltare embrionară. De altfel, distincția dintre zona medulară și cea corticală nu poate fi făcută decît din ziua a 13-a de incubație (V e n z k e).

În gonade, reacția fosfatazei alcaline este timpuriu pozitivă, începînd cu a cincea zi de incubație. Deci, din această perioadă se diferențiază morfologic cele două tipuri de gonade, reacția fiind mai intens pozitivă în ovogonii. Din datele experimentale ale diferiților cercetători se pare că atît testiculul, cît și ovarul embrionar au o secreție a cărei acțiune nu este încă precizată.

Din datele mai sus arătate reiese că, în glandele endocrine, apariția fosfatazei alcaline precedă diferențierea morfo-fiziologică, prezentînd maximul de intensitate o dată cu apariția primelor semne morfologice caracteristice glandelor adulte în funcțiune. Pe baza activității fosfatazei alcaline am putea spune că nu există un sincronism în „atingerea pragului funcțional'' pentru toate glandele endocrine, ci că există o succesiune în maturația lor.

Mezonefrosul arată net din ziua a cincea de incubație prezența fosfatazei alcaline la nivelul nucleilor și al porțiunii apicale a celulelor care constituie tubii, intensificîndu-se în tot timpul dezvoltării embrionare (fig. 111). În nici un moment al dezvoltării nu s-a observat prezența fosfatazei în glomeruli. În unii tubi, numai nucleii posedă o reacție medie a fosfatazei alcaline, în timp ce alți tubi sînt negativi. Pe măsura dezvoltării mezonefrosului, tubii contorți cu reacția intens pozitivă la nivelul membranei apicale devin tot mai numeroși.

Metanefrosul este negativ în prima perioadă a dezvoltării sale. În ziua a zecea de incubație. primordiile conductelor excretoare prezintă o slabă reacție fosfatazică la nivelul nucleilor.

Țesutul metanefrogen care va da naștere capsulei și sistemului de canale secretoare ale nefronului prezintă o reacție fosfatazică mai intensă la nivelul nucleilor, fiind vorba de un proces morfogenetic activ. Reacția caracteristică morfogenezei o întîlnim pînă în ziua a 12-a de incubație ; de la această dată, aspectele funcționale, pe baza localizării și intensității reacției fosfatazei alcaline, sînt mai numeroase, cuprinzînd noi nefroni (fig.111). Glomerulii sînt negativi, în timp ce nucleii celulelor celor două foițe ale capsulei sînt pozitivi. Spre sfîrșitul incubației se observă o netă diferențiere la nivelul diferitelor segmente ale nefronului în ceea ce privește localizarea și intensitatea reacției fosfatazice, arătînd deci o diferențiere funcțională a acestor diferite segmente. Corpusculii renali rămîn permanent negativi. Tubul contort, chiar din prima lui porțiune, prezintă o reacție intens pozitivă la marginea apicală a celulelor, restul citoplasmei și nucleii fiind negativi. În alți tubi contorți, marginea în perie este negativă, în timp ce citoplasma, în porțiunea apicală și pe laturile nucleului, este intens pozitivă, nucleii putînd fi negativi sau ușor pozitivi. Aceste aspecte denotă că este vorba de o activitate funcțională diferită. Pe măsură ce ne îndepărtăm de tubii contorți se remarcă o scădere a intensității reacției fosfatazei alcaline, care se negativează la nivelul tubilor colectori.

Prezența fosfatazei alcaline, după opinia generală, indică funcția de resorbție a glucozei ; această funcție apare deci foarte de timpuriu în mezonefros (ziua a cincea) la nivelul tubilor contorți, iar la metanefros după a 11-a zi de incubație.

Plămînul prezintă o reacție pozitivă medie din ziua a 14-a de incubație.

Epiteliul tubului digestiv prezintă, în porțiunea apicală, un lizereu cu reacție pozitivă începînd cu ziua a cincea — a șasea de incubație. În mucoasa intestinală, fosfataza alcalină este considerată ca enzima determinantă a resorbției hexozelor și a diverselor molecule lipidice. De altfel, la aceeași vîrstă, după cum am arătat, se observă și prezența glicogenului în celulele epiteliale ale tubului digestiv.

În inimă și în vasele sanguine, endoteliul prezintă o reacție pozitivă a fosfatazei alcaline.

În mușchi, reacția fosfatazei alcaline este intens pozitivă, dar numai la nivelul inervației, în rest menținîndu-se negativă sau slab pozitivă.

Cartilajele prezintă o reacție intens pozitivă din ziua a noua de incubație, fiind premergătoare proceselor de osificare.

Reacția fosfatazei alcaline arată diferite intensități în mezenchim, în funcție de procesul morfogenetic al diferitelor organe de origine mezenchimală.

Din datele obținute de noi și de alți cercetători asupra valorii reacției fosfatazei alcaline putem conchide că prezența, localizarea și intensitatea reacției acestei enzime ne pot fi folositoare în aprecierea diferențierii morfo-funcționale a organismului în dezvoltare. Reacția slab pozitivă este caracteristică proceselor de morfogeneză și localizarea fosfatazei alcaline este nucleară ; reacția medie localizată în citoplasmă precedă procesele de diferențiere, iar cea intensă, care cuprinde nucleul și citoplasma, sau numai citoplasma, denotă funcții specifice ale celulelor organelor și țesuturilor respective.

Studiul diferitelor enzime devine astfel o necesitate în aprecierea funcțiilor organelor embrionare.

Dezvoltarea cercetărilor de histochimie, prin perfecționarea metodelor și înlăturarea inconvenientelor care mai persistă încă în acest domeniu, va aduce o contribuție deosebit de prețioasă la cunoașterea și înțelegerea proceselor morfo-funcționale din perioada embrionară a dezvoltării organismelor.

BIBLIOGRAFIE

1. Aron M., *De la concomitance entre l'apparition des ilots de Langerhans fonctionnels chez l'embryon et l'établissement de la fonction glycogènique du foie*, C. R. Soc. biol., 1920, t. 83.
2. Blanquet P. Stoll R. et Capot L., *Sur l'activité des thyroides de l'embryon de poulet étudié dans l'œuf „marqué" par l'administration de radioiode à la poule*, C. R. Soc. biol., 1952, t. CXLVI, nr. 13–14.
3. Boell E. J. a. Shen S. C., *Functional Differentiation in Embryonic Developement. I. Cholinesterase Activity of induced Neural Structures in Amblystoma punctatum*, J. Exp. Zool., 1947, nr. 97.
4. Dawson A. B., *Histochemical Evidence of early Differentiation of the Suprarenal Gland of the Chick*, J. Morphol., 1953, t. 2, nr. 3.
5. Dorfman V. A. i Epstein S. M., *Ghistohimiia embrionalnoi differențiații. Metoda okrașivaniia dlia opredelenia șelocinoi fosfatazî*, D. A. N. SSSR, 1950, v. LXXII, nr. 5.
6. Koștoianț H. S., *Fiziologie comparată*, Ed. med., 1954.
7. Leibson L. G., *Nervno-gumoralinaia reguliația glikemii v tecenie ontogheneza*, Fiziol. j., 1950, t. XXXVI, nr. 6.
8. Marinescu Gh., *La valeur des réactions histologiques des ferments oxidants*, Bull. d'histol. appl., 1925, vol. 2.
9. Menkes B., Rîmniceanu C. și Miclea C., *Cercetări experimentale asupra posibilităților de regenerare și compensare ale măduvei embrionare*, Bul. științ. Acad. R.P.R., Secția de științe medicale, 1955, t. VII, nr. 1.
10. Mirza V., Rîmniceanu C., Miclea C., Lungulescu M. și Litvac B., *Interrelațiile dintre vitelus și embrionul de găină. Fosfataza alcalină și reacția Feulgen în ontogeneza embrionului de găină*, Bul. științ. Acad. R.P.R., Secția de științe medicale, 1952, t. IV, nr. 4, p. 845.

11. Moog F., *The Functional Differentiation of the Small intestine. I. The Accumulation of Alkaline Phosphe, monoeste ase in the Duodenum of the Chick*, J. exp. Zool. 1950, t. 115.
12. Parhon C. I., *Quelques considérations sur l'importance des fonctions endocrines pendant la vie embryonnaire et foetale et sur leur rôle dans l'organogénèse.*, Presse méd., 1913, nr. 80.
13. Parhon C. I., Laurian L, Bălăceanu M. şi Albu N., *Încercări de dirijare a embriogenezei.* Nota 5. *Acțiunea insulinei asupra dezvoltării embrionare la găină*, în *Lucrările Sesiunii științifice a Secției de științe medicale a Academiei R.P.R. din 22—24 ianuarie 1954*, Ed. Acad. R.P.R., 1955. p. 607.
14. Rîmniceanu C., Miclea C. şi Drăgan M., *Glicogeneza în cursul dezvoltării embrionului de găină*, Bul. științ. Acad. R.P.R., Secția de științe medicale, 1955, t. VII, nr. 3.
15. Roche J., *Biochimie et chimie biologique des phosphatases*, *Actualités biochimiques*, 1947, nr. 10.
16. Sebruyns M., *Etudes histochimique de la localisation de la phosphatase alcaline dans l'utérus gravide et les tissus foetaux chez la souris blanche*, Arch. d'anat. microscop., 1951, t. 40, nr. 3.
17. Steger C. I., *The Existence of Different Phosphatases*, Mikroscopie, 1953, t. 8, nr. 9—10.
18. Studițki A. N., *Endocrinie vzaimosviazi v embrionalnom razvitie u vissih pozvonocinih*, D. A. N. SSSR, 1947.
19. Ten Cate G., *The biochem. a. struct. basis of morphogenesis*, Symposion Utrecht, 1952.
20. Volohov A. A., *Zakonî ontogheneza nervnoi deiatelnosti v svete evoluționnoi ucenia*, Moscova Leningrad Izv. Akad. Nauk SSSR, 1951.

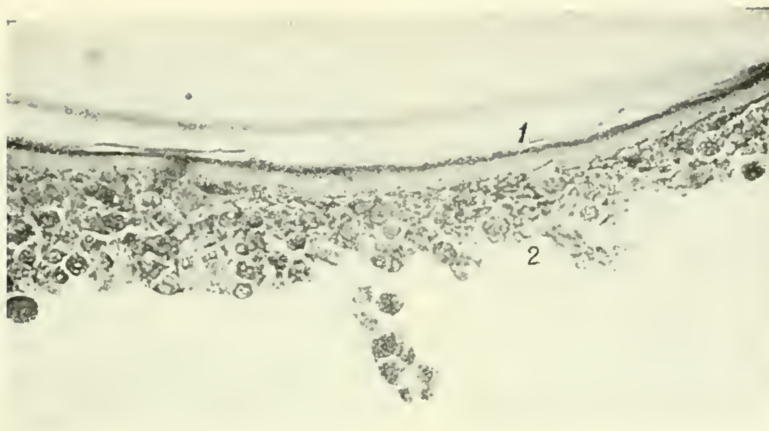


Fig. 93. — Embrion de 24 de ore de incubaţie. Microfotografie.
1 — Membrana vitelină cu glicogen; 2 — globule viteline cu glicogen.

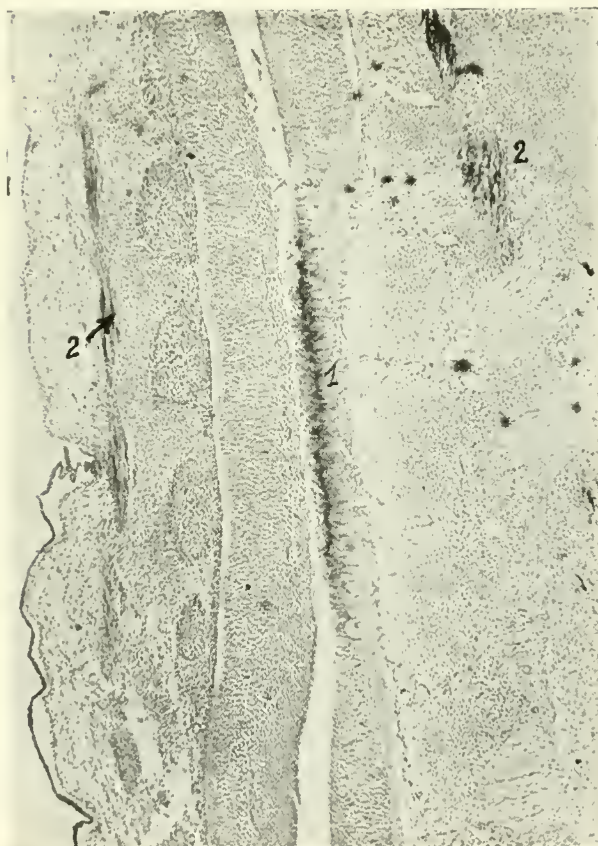


Fig. 94 — Embrion de 5 zile de incubaţie. Microfotografie
1 — măduva spinării cu glicogen; 2 — mioblaştii cu glicogen;

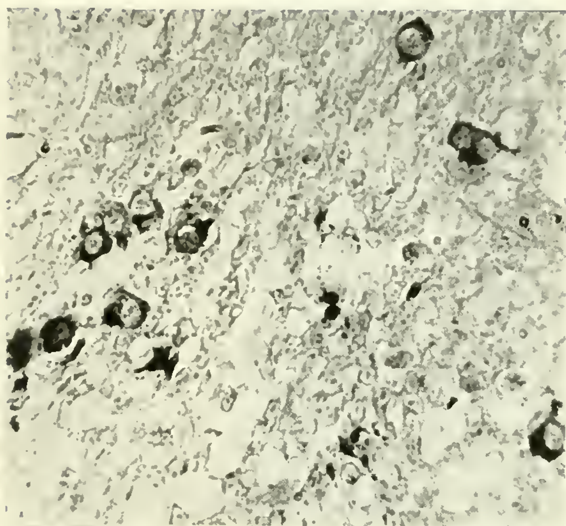


Fig. 95. — Celule nervoase simpatice în migrație cu bogat conținut în glicogen. Embrion de 5 zile de incubație. Microfotografie.

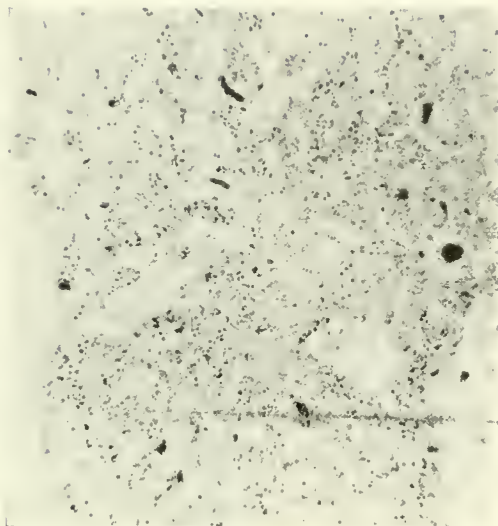


Fig. 96. — Ficat cu glicogen la un embrion de 6 zile de incubație. Microfotografie.



Fig. 97. — Glicogen în ficatul embrionului de 10 zile de incubație, desen la camera clară.

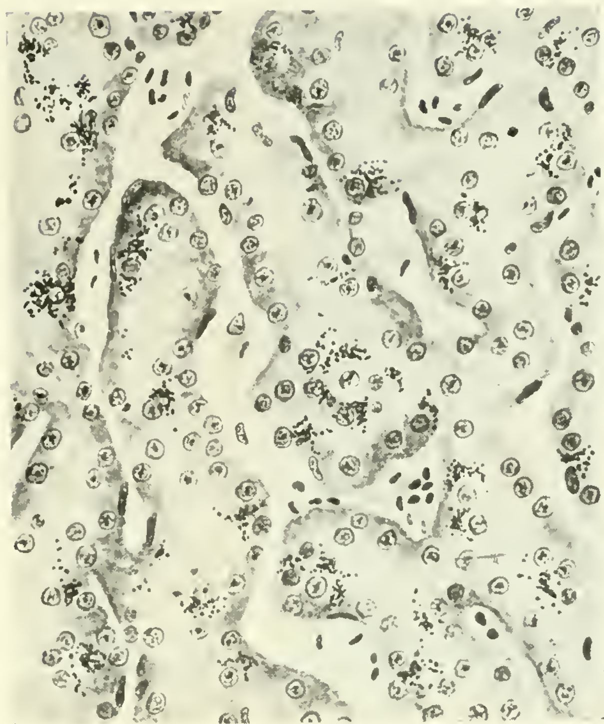


Fig. 98. — Glicogen în ficatul embrionului de 13 zile de incubaţie; desen la camera clară.

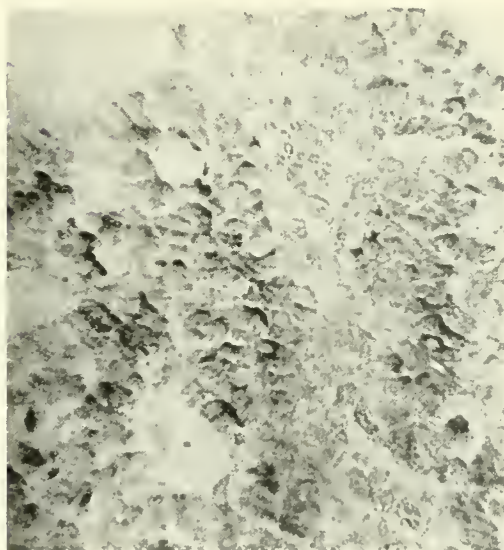


Fig. 99. — Glicogen în ficatul embrionului de 5 zile de incubaţie sub acţiunea extractului de pancreas embrionar de 12 zile incubaţie. Microfotografie.

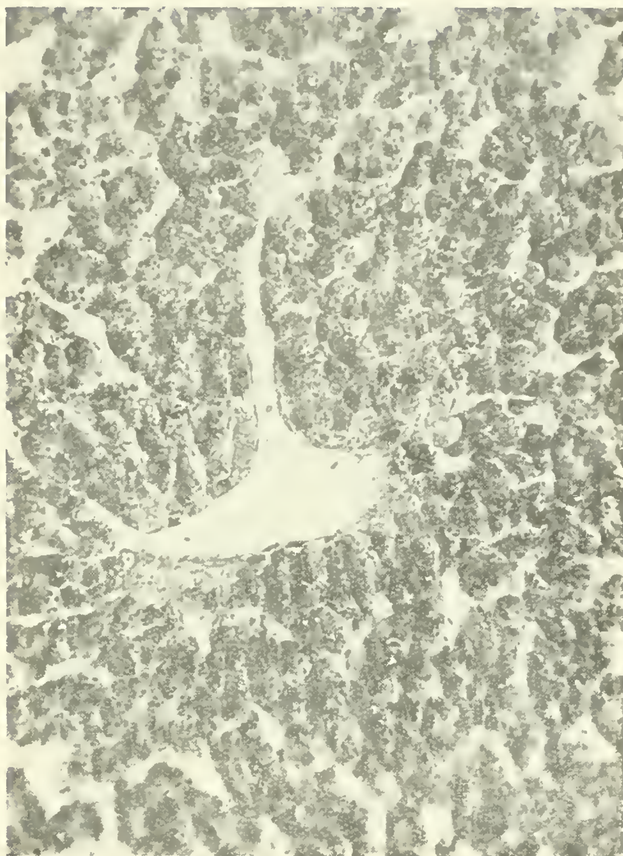


Fig. 100. — Ficat supraincărcat cu glicogen sub acţiunea morfinei la un embrion de 13 zile de incubaţie. Microfotografie.

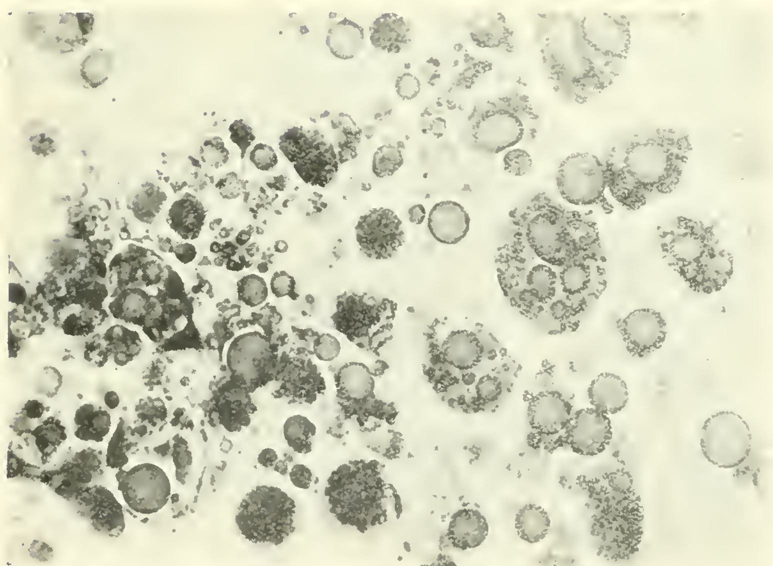


Fig. 101. — Reacţia fosfatazei alcaline în globulele de vitelus la 6 ore de incubaţie. Microfotografie.



Fig. 102. — Embrion de 2 zile de incubaţie. Reacţia fosfatazei alcaline în mezodiencefal, cupa optică şi porţiunea ventrală a măduvei spinării.



Fig. 103. — Embrion de 17 zile de incubaţie. Reacţia fosfatazei alcaline.

1 — la nivelul diencefalului; 2 — la baza emisferelor cerebrale; 3 — la nivelul bulbului.

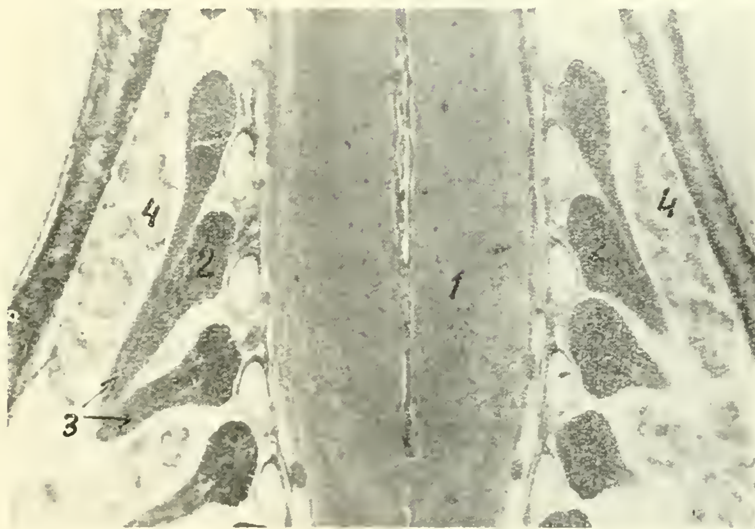


Fig. 104. — Embrion de 13 zile de incubaţie: Reacţia fosfatazei alcaline intens pozitivă.

1 — la nivelul măduvei spinării; 2 — al ganglionilor rahidieni; 3 — al nervilor din regiunea metanefrosului; 4 — metanefrosul are o reacţie medie pozitivă.



Fig. 105. — Reacţia fosfatazei alcaline în ficatul embrionului de 10 zile de incubaţie.

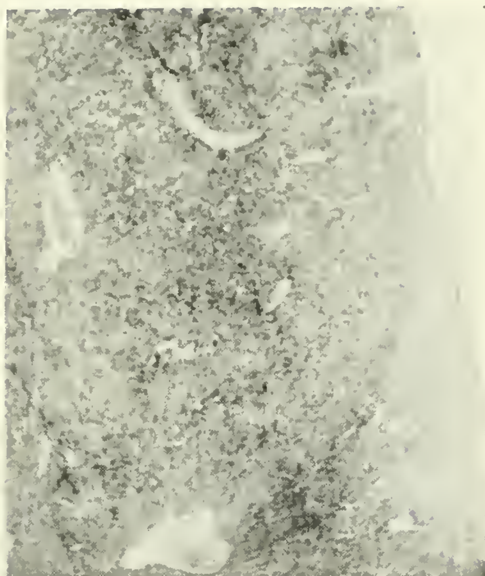


Fig. 106. — Reacţia fosfatazei alcaline în ficatul embrionului de 13 zile de incubaţie.

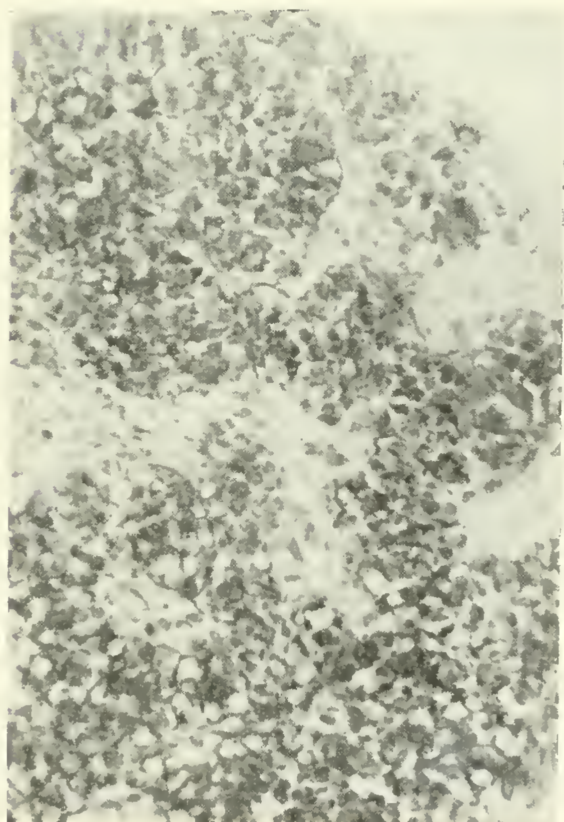
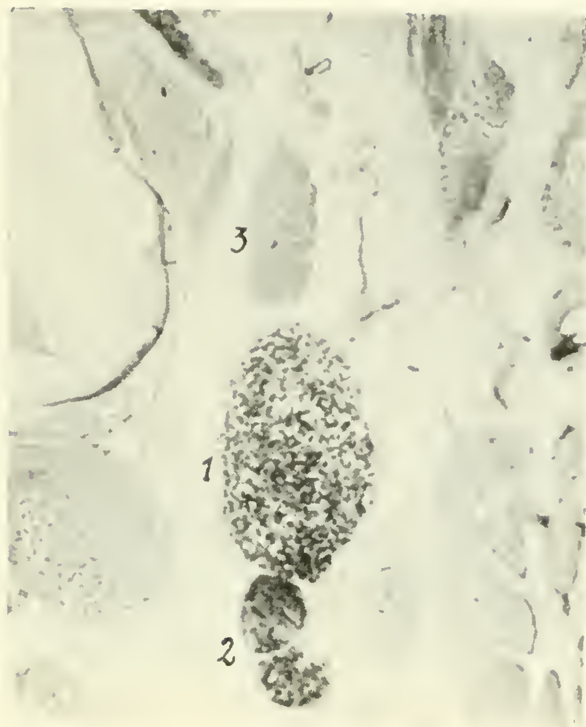


Fig. 107. — Reacţia fosfatazei alcaline la nivelul hipofizei la embrionul de 11 zile de incubaţie.

Fig. 108. — Embrion de 12 zile de incubaţie. Reacţia fosfatazei alcaline.
1 — la nivelul tiroidei; 2 — paratiroidei; 3 — timusului.



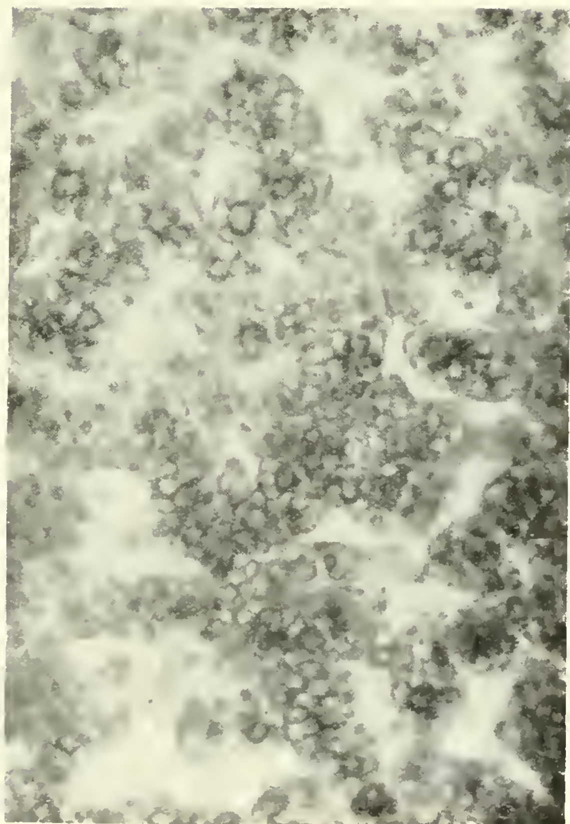


Fig. 109. — Embrion de 12 zile de incubaţie. Reacţia fosfatazei alcaline la nivelul tiroidei.



Fig. 110. — Embrion de 7 zile de incubaţie. Reacţia fosfatazei alcaline la nivelul suprarenalei.

1 — Reacţia pozitivă în celulele nervoase simpatice de la periferie; *2* — Reacţia negativă la nivelul cordoanelor.

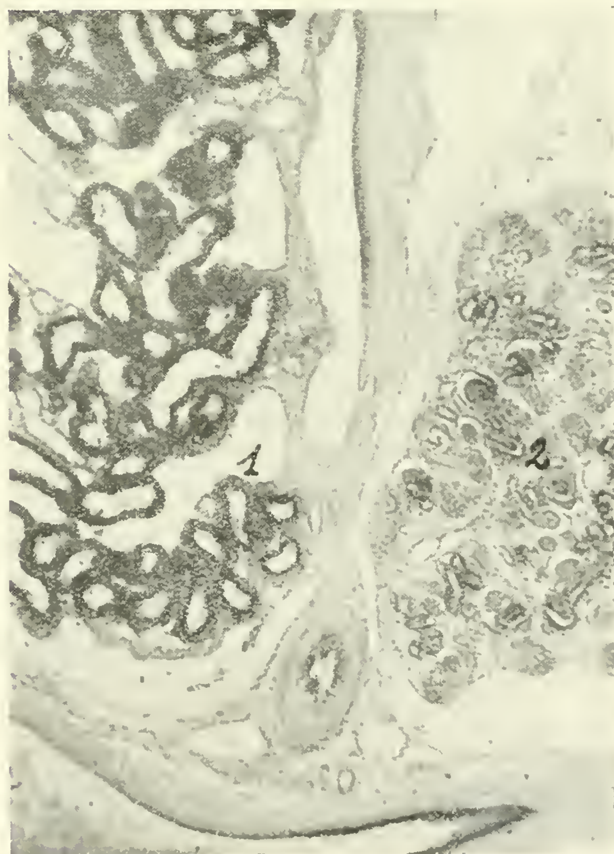


Fig. 111. — Embrion de 12 zile de incubaţie. Reacţia fosfatazei alcaline

1 — la nivelul mezonefrosului *2* — la nivelul metanefrosului.

ANEXA III

EMBRIONUL DE GĂINĂ ÎN MOMENTELE PRINCIPALELOR INTERVENŢII. TOPOGRAFIA REGIUNILOR OPERATOARE

Această anexă conţine serii de imagini, reprezentînd embrionul de găină sau regiuni ale corpului embrionului, în principalele faze de dezvoltare în care se execută intervenţiile descrise în acest volum.

Cunoaşterea topografiei acestor regiuni operatoare este indispensabilă pentru efectuarea corectă a intervenţiilor, dar noi sperăm că imaginile inserate aci vor putea să sugereze cititorului intervenţii noi şi vom putea cîştiga astfel noi adepţi ai metodelor embriologiei experimentale.

O primă serie de imagini prezintă embrionii vii, *in situ*, aşa cum se văd prin fereastra tăiată în coaja oului (fig. 112, 113, 114 şi 115).

Fotografiile reprezentînd embrioni vii, de 2; 3; 4 şi 5 zile, obţinute cu ajutorul unei pelicule fotografice insensibile la roşu, redau cu deosebită claritate reţelele vaselor viteline şi alantoidiene.

Urmează imaginile plăcilor embrionare de 19—48 de ore de incubaţie, obţinute prin procedeul înnegririi osmice. Formaţiunile embrionare vii au fost acoperite cu o soluţie de acid osmic 1%, observîndu-se după aceea înnegrirea incluziilor lipidice.

După ce primordiile apar cu suficientă claritate, placa se excizează şi se păstrează în glicerină (fig. 116, 117, 118, 119, 120 şi 121). Embrionul de 20 de ore de incubaţie (fig. 117) este obţinut prin coloraţia totală cu carmin.

Secţiunile transversale prin embrionul de 15 şi 24 de ore de incubaţie (fig. 122, 123, 124, 125 şi 126) vor contribui la înţelegerea preparatelor totale.

Imaginea din figura 127 completează seria printr-o fotografie luată pe viu la un embrion de 48 de ore, colorat vital cu albastru de Nil prin depunerea unui portcolorant de agar.

Figurile 128 şi 129 prezintă insulele lui Wolff şi Pander (circa 30—35 de ore incubaţie) pe preparate totale, obţinute cu metoda pseudoperoxidazelor. Placa embrionară este tratată cu soluţia de benzidină acidulată, iar apoi cu apă oxigenată. Elementele conţinînd hemoglobina se colorează intens în albastru, apoi în brun-închis (Spirito).

Urmează seria embrionilor izolați de membranele lor anexe, fotografiați proaspeți, nefixați. Seria cuprinde embrioni de la a 4-a pînă la a 11-a zi de incubație (fig. 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136 și 137).

Figurile 138 și 139, sînt secțiuni transversale prin trunchiul embrionului la începutul celei de a treia zi de incubație. Printre altele ele înfățișează și raportul dintre celomul extra - și intraembrionar și căile de acces spre acesta.

Secțiunea longitudinală și transversală prin tubul neural și șirul ganglionilor rahidieni (fig. 140) înfățișează topografia regiunii operatoare în cazul intervențiilor asupra tubului neural.

Figurile 141, 142, 143 și 144 sînt secțiuni sagitale prin embrionul de 4 zile de incubație (impregnații argentice). Sînt înfățișați nervii cranieni (n. spinal, n. vag, n. glosofaringian, n. hipoglos și ramurile anterioare ale primilor nervi rahidieni), rombencefalul și vezicula otică.

Figura 145 prezintă rombencefalul în raport cu veziculele otice, rădăcinile trigemenului, tavanul subțire al rombencefalului, prin care se poate pătrunde spre podeaua lui.

Figura 146 prezintă o secțiune prin corpul embrionului de 3 zile de incubație, care a fost lăsată în legătură cu membranele sale extraembrionare. Fotografia arată raporturile dintre corpul embrionului și aceste membrane.

Figura 147 este o secțiune transversală prin corpul embrionului de găină de 6 zile de incubație (impregnație argentică), înfățișînd momentul apariției metanefrosului (dorsal de mezonefros). Se observă legătura simpaticului cu primordiile glandelor suprarenale.

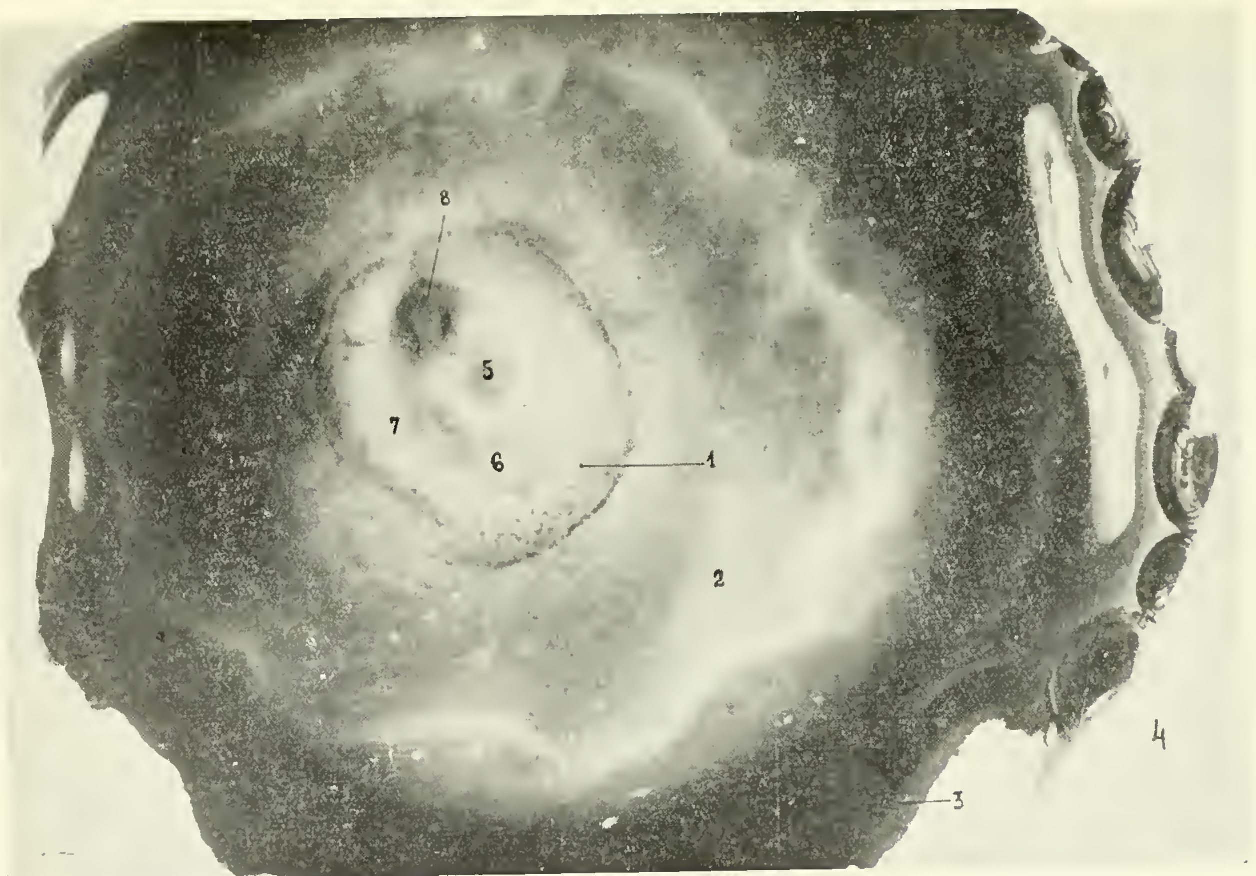


Fig. 112. — Embrion de 48 de ore de incubație. Vederea formațiunilor embrionare *in situ*, pe viu, fără colorație vitală :
1 — aria vasculară ; *2* — gălbenușul ; *3* — a bușul ; *4* — coaja ; *5* — nucleul Pander ; *6* — aria pelucidă ; *7* — aria opacă ; *8* — capul embrionului.



Fig. 113. — A treia zi de incubaţie, fotografie pe viu.

1 — aortele dorsale, *2* — circulaţia vitelină (pe viu); *3* — inima; *4* — arcuri branhiale arteriale; *5* — vene viteline; *6* — artera vitelină; *7* — sinusul marginal; *8* — vase viteline laterale (dreapta şi stînga); *9* — vene viteline (anterioară şi posterioară).



Fig. 114. — A patra zi de incubaţie. Fotografia luată pe viu.

1 — vezicula alantoidiană ; *2* — venele cardinale, anterioară şi posterioară ; *3* — *sinus reuniens* Cuvier ; inimă : *4* — atriu ; *5* — ventricul ; *6* — bulb ; *7* — arcurile bronhiale arteriale ; *8* — aorta dorsală ; + vena cardinală posterioară ; *9* — vase viteline, *10* — sinusul terminal (corpul embrionului învelit de amnios). este culcat pe partea sa stîngă.

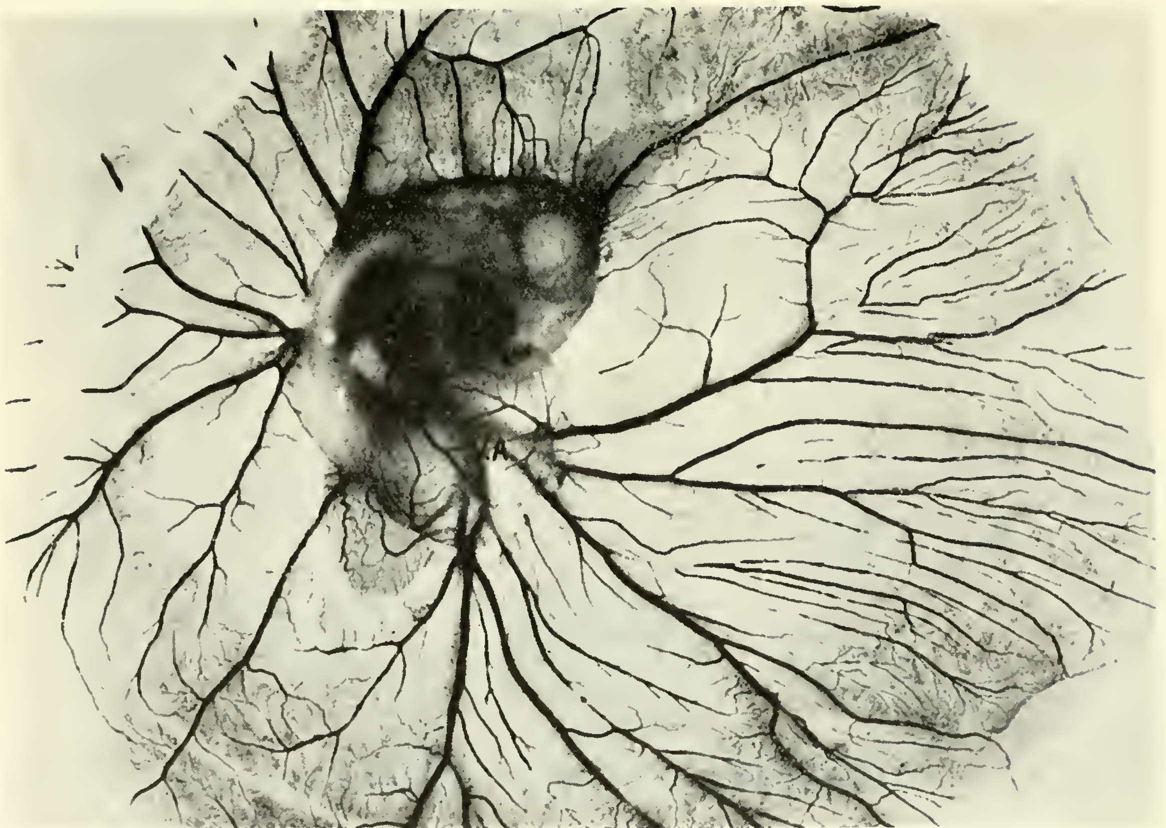


Fig. 115. — A cincea zi de incubaţie. Fotografie pe viu. Corpul embrionului se vede prin transparenţa amniosului :

1 — vezicula alantoidiană cu vasele ei ; 2 — vasele viteline. A început procesul de scufundare a arterelor viteline

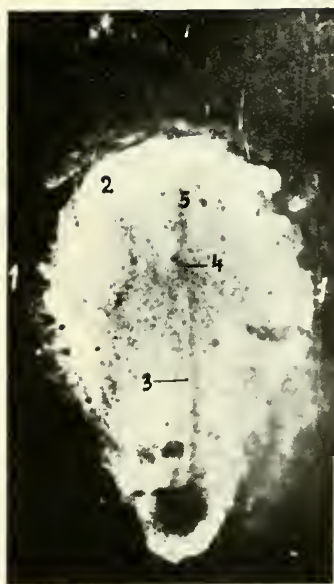


Fig. 116. — Placa embrionară de circa 19 ore de incubaţie. Preparat total (acid osmic, glicerină).

1 — aria opacă, înnegrită prin acţiunea acidului osmic asupra globulelor viteline din sinciţiul vitelin; *2* — aria pelucidă are formă de pară; *3* — linia primitivă; *4* — nodul Hensen; *5* — prelungirea cefalică (se vede prin transparenţa ectodermului). Sub aria pelucidă s-a format spaţiul subembrionar conţinînd lichidul subembrionar.

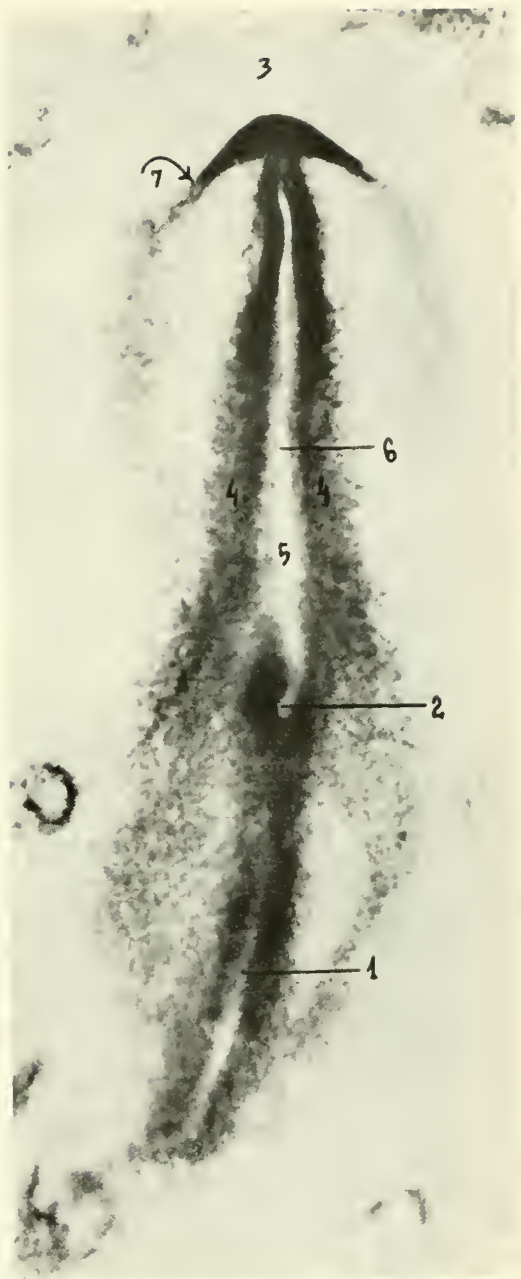


Fig. 117. — Placa embrionară de circa 20 de ore de incubaţie. Preparat total. Coloraţie totală cu carmin, clarificare.

1 — linia primitivă relativ scurtată; *2* — nodul primitiv apare aici ca gropă primitivă cu comunicare excentrică spre şanţul neural; *3* — proamnios (regiune lipsită de mezoderm, situată înaintea capului); *4* — ridicăturile neurale, între care se vede şanţul neural, (*5*); în fundul acestuia, ca o linie fină, coarda dorsală (*6*); *7* — punga subcefalică.

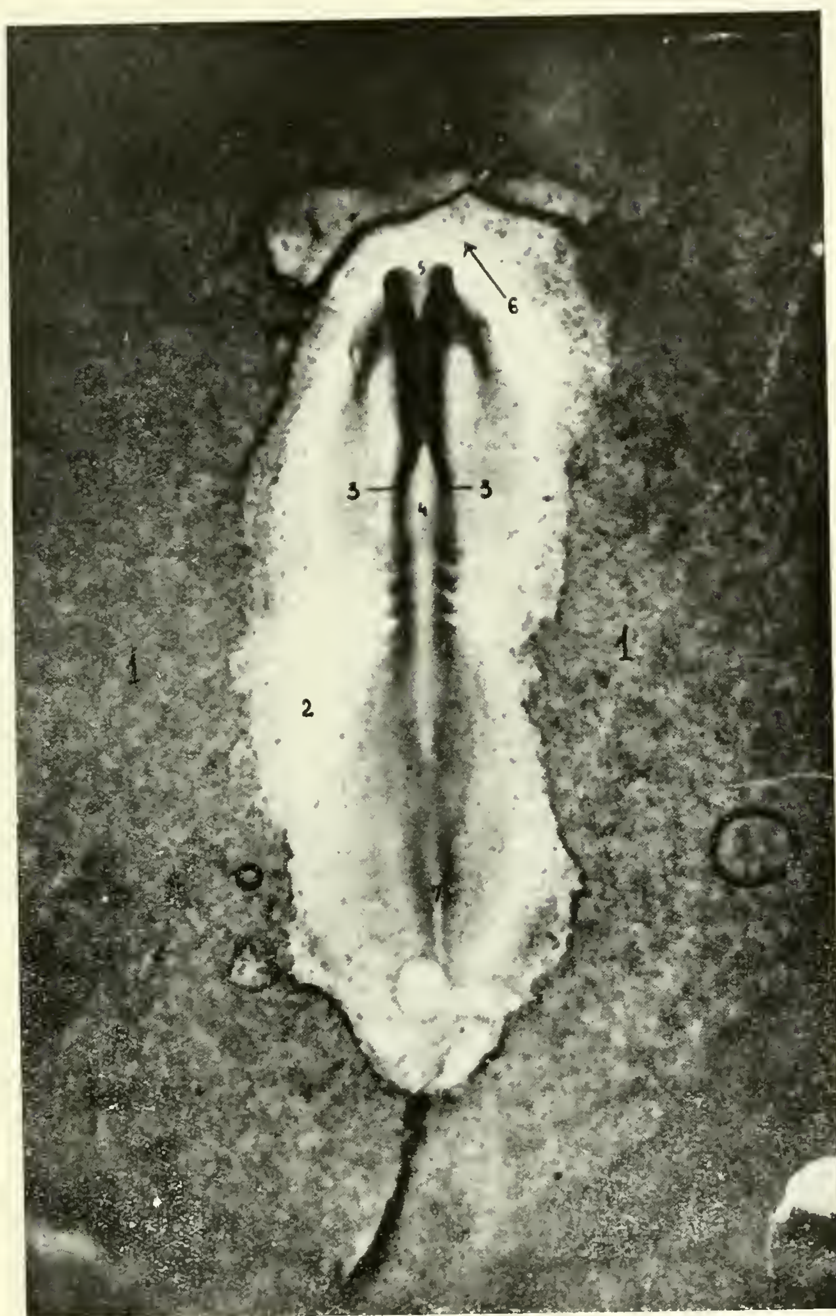


Fig. 118. – Embrion de 21 de ore de incubaţie (patru somite diferenţiate). Acid osmic, glicerină. Preparat total.

1 – aria opacă cu insulele sanguine Wolff-Pander; *2* – aria pelucida; *3* – ridicăturile neurale; *4* – şanţul neural în parte închis, formînd tubul neural la nivelul viitorului rombencefal; *5* – neuroporul anterior; *6* – cuta amniotică cranială; *7* – linia primitivă din ce în ce mai scurtă şi caudală

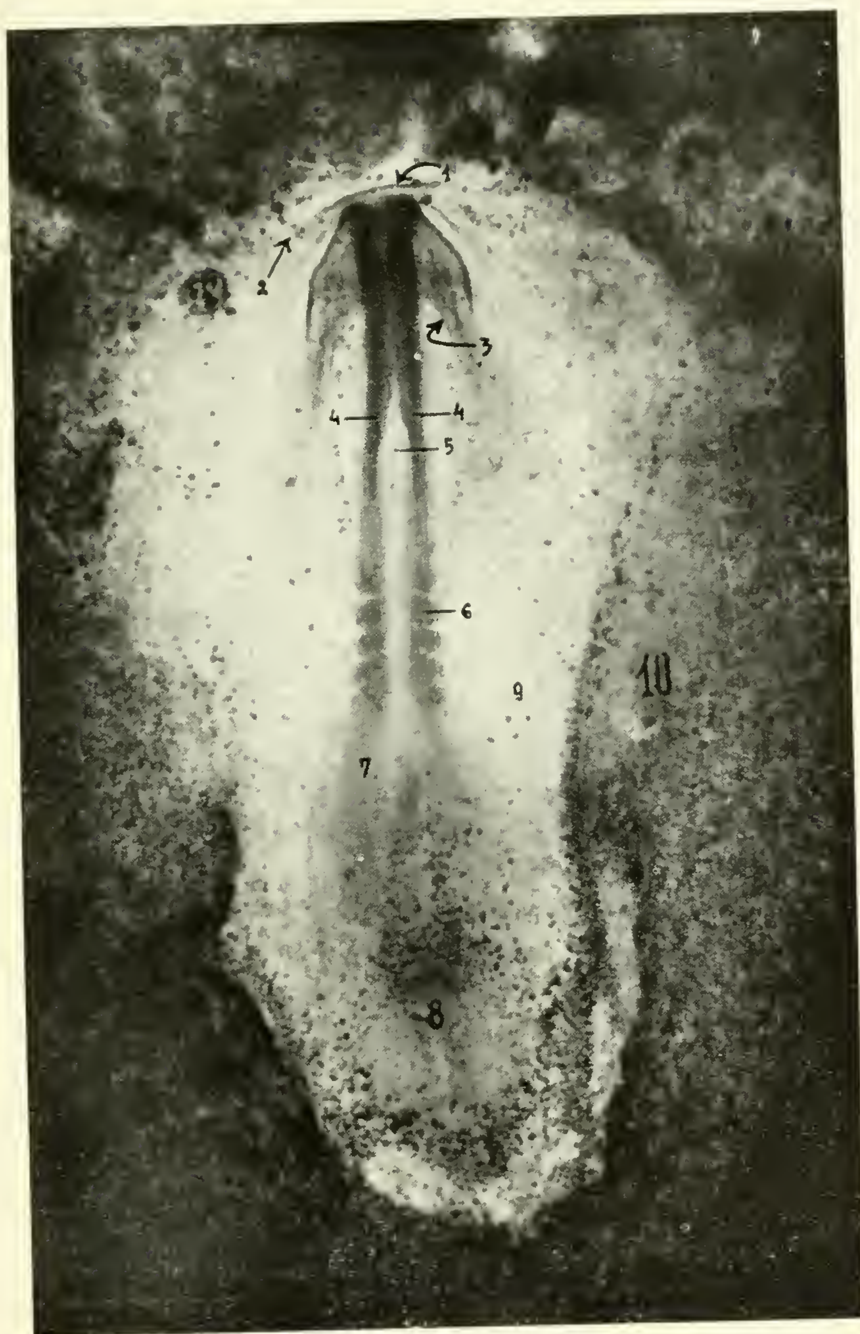


Fig. 119. Embrion de 24 de ore de incubație. Preparat total. Acid osmic, glicerină. Cinci somite diferențiate.

1 – intrarea în punga subcefalică; *2* – cuta amniotică craniană; *3* – marginea orificiului de intrare în intestinul cefalic (faringe) – aici se află primordiul tubului cardiac; *4* – ridicăturile neurale; *5* – coarda dorsală; *6* – somite; *7* – mezodermul lateral încă nesegmentat; *8* – regiunea liniei primitive; *9* – aria pelucidă; *10* – aria opacă.

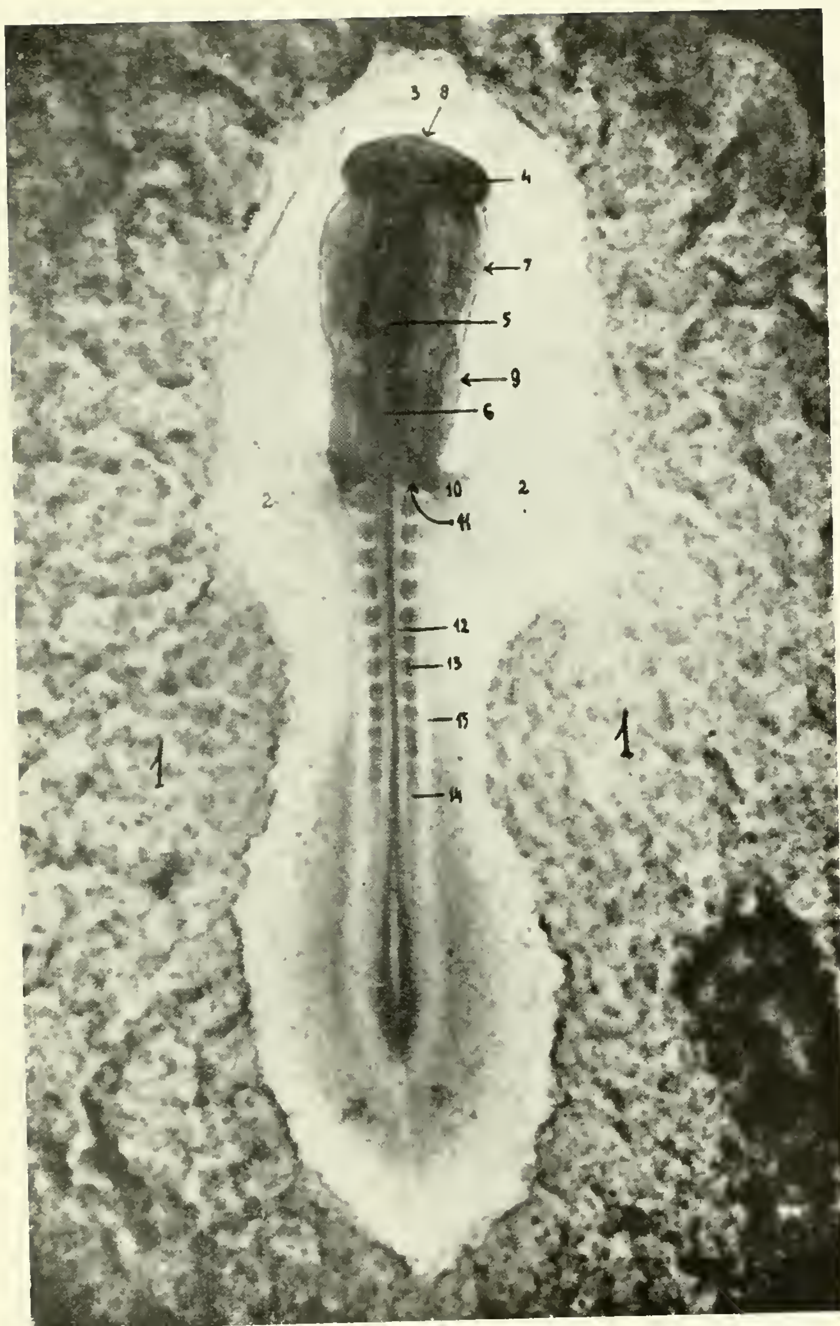


Fig. 120. — Embrion de circa 35 de ore de incubaţie. Acid osmic, glicerină, preparat total.

1 — aria opacă cu insulele şi sinusoidele sanguine; *2* — aria pelucidă cu sinusoide sanguine; *3* — cuta amniotică craniană; *4* — diencefalul cu veziculele optice primare; *5* — mezencefalul; *6* — rombencefalul; *7* — ectodermul cefalic; *8* — neuroporul anterior; *9* — tubul cardiac; *10* — vena omfalo-mezenterică; *11* — intrare în intestinul cefalic; *12* — tubul neural; *13* — somite; *14* — mezodermul nesegmentat; *15* — mezodermul lateral (regiunea pro- şi mezonefrosului).

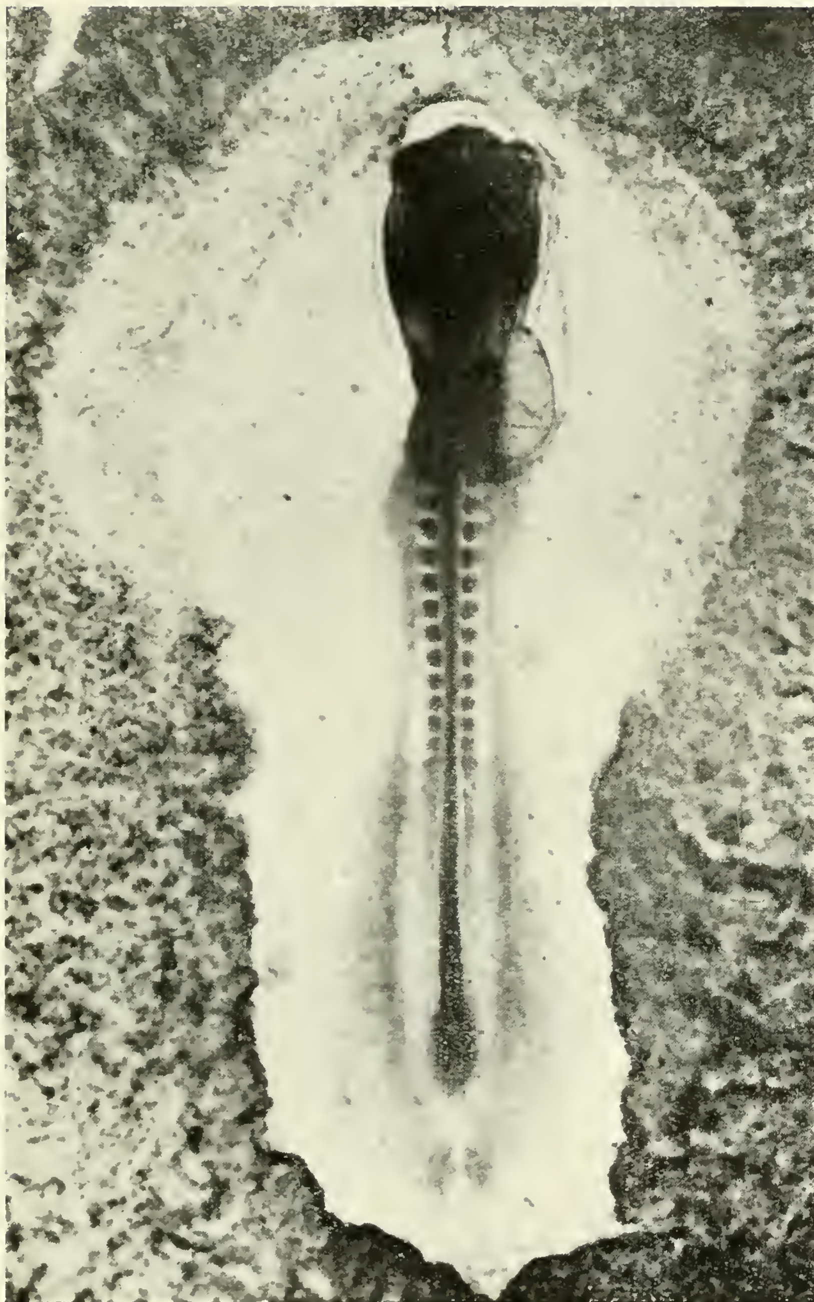


Fig. 121. — Embrion de circa 35 de ore de incubaţie. Acid osmic, glicerină, preparat total. Legenda ca în figura precedentă. Tubul cardiac proemină înspre dreapta.

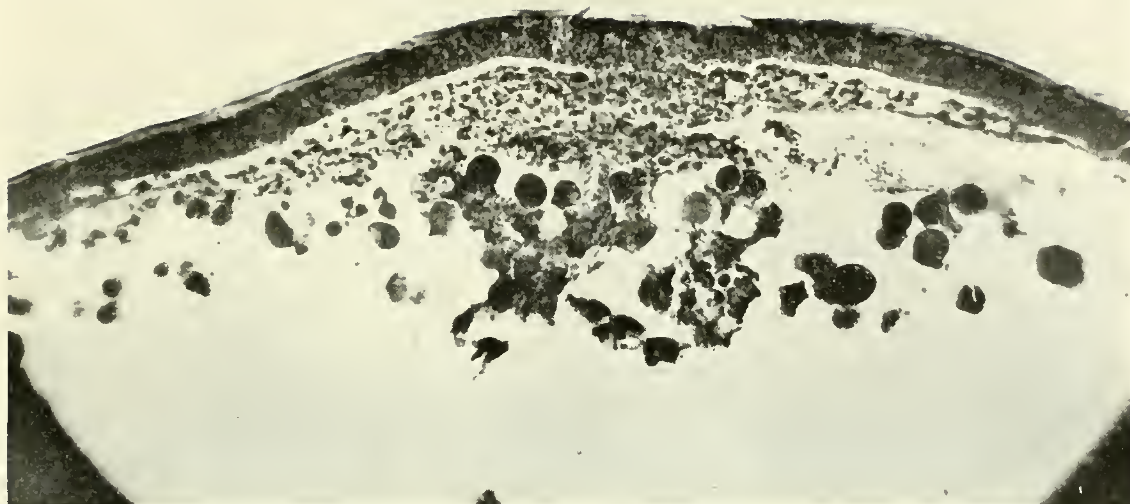


Fig. 122. – Secţiune prin placa embrionară de 15 ore de incubaţie. Ectodermul format dintr-un epiteliu multistratificat. Linia primitivă de la care pleacă în stînga şi dreapta mezodermul. Endodermul nu este aici diferenţiat de masa mezodermului.

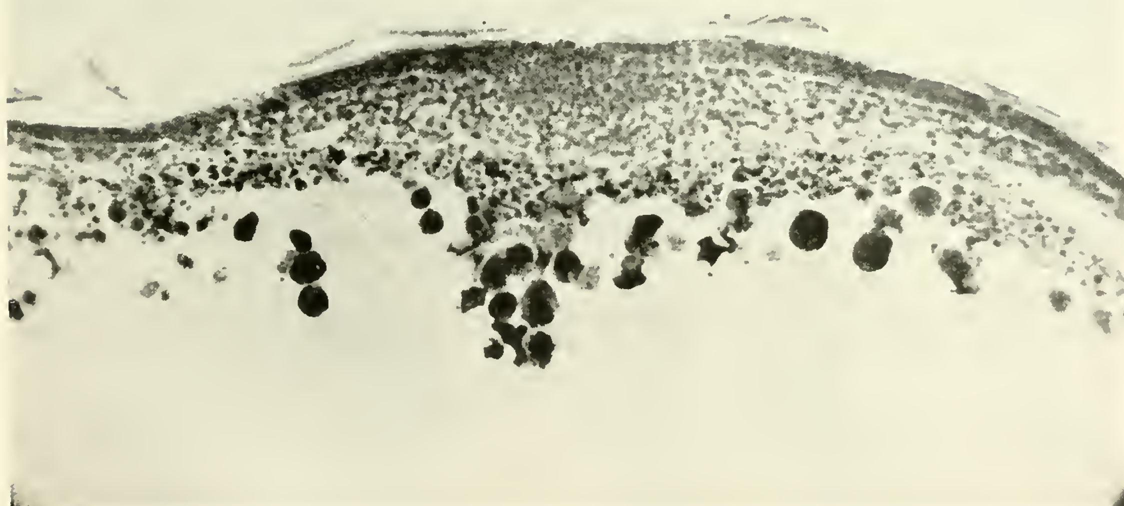


Fig. 123. – Secţiune prin placa embrionară de 15 ore de incubaţie. Linia primitivă (continuitate între ecto-mezo- şi endoderm). Mezodermul (se întinde de ambele părţi ale liniei primitive sub ectoderm), Endoderm. Vitelus.

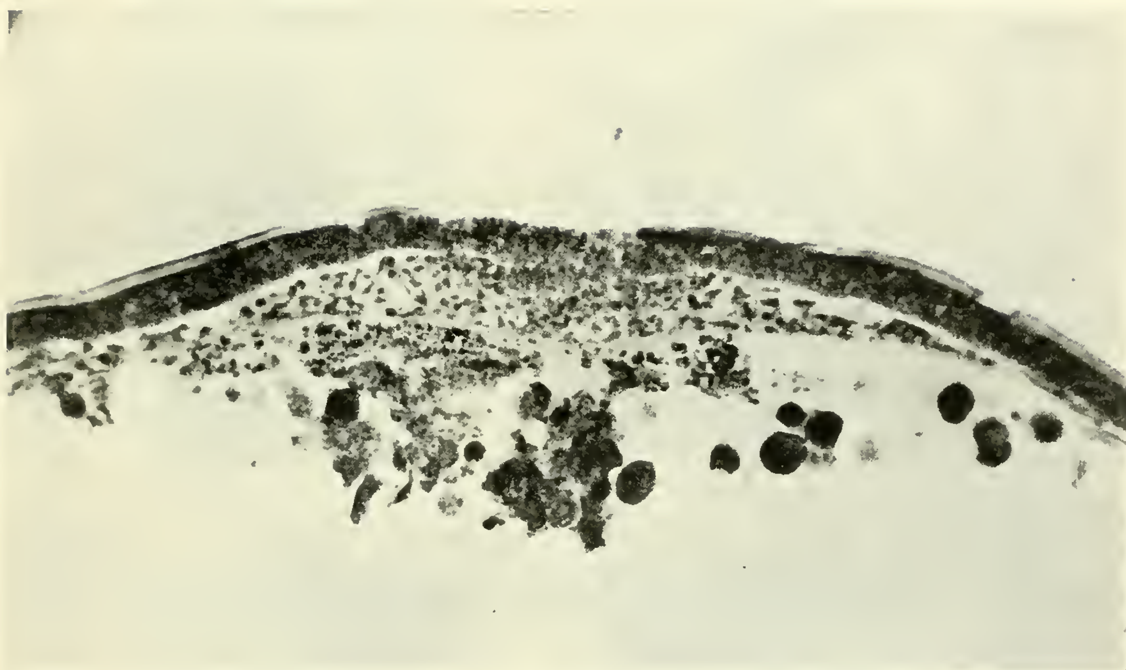


Fig. 124. — Secţiune prin placa embrionară de 15 ore de incubaţie. Ectoderm, mezoderm, endoderm, vitelus, linia primitivă; celulele mezodermului formează o reţea spaţială mezenchimatoasă. Mezo- şi endodermul net delimitat de vitelus.

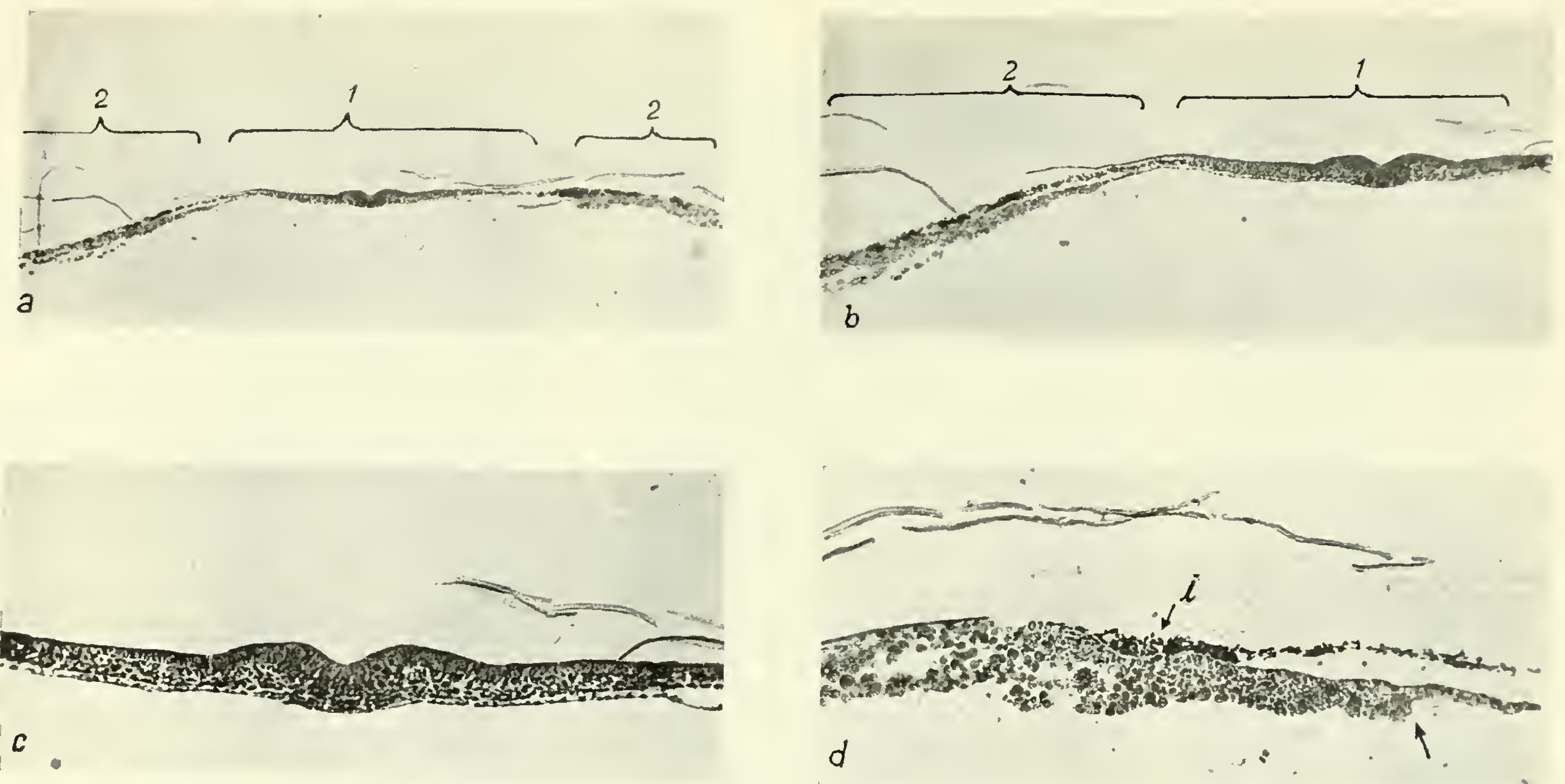


Fig. 125. — (*a*, *b*, *c* și *d*) — Secțiuni prin placa embrionară de 24 de ore de incubație. Șanțul primitiv sus și regiunea liniei primitive.

1 Ecto- mezo- și endodermul la nivelul ariei pelucide; *2* ecto- mezo- și endodermul la nivelul ariei opace; cadrul vitelin al ariei opace; membrana vitelioă (fragmentată = artefact); *d*. endodermul se transformă în țioutul ariei opace în sincițiul vitelin (o rețea de celule endodermice în ochiurile căreia se află elemente viteline printre care se disting singraule, megasfere, globule viteline cu „centru protoplasmatic" etc.). Raportul strîns al insulelor sanguine (*i* ↓) cu sincițiul vitelin.

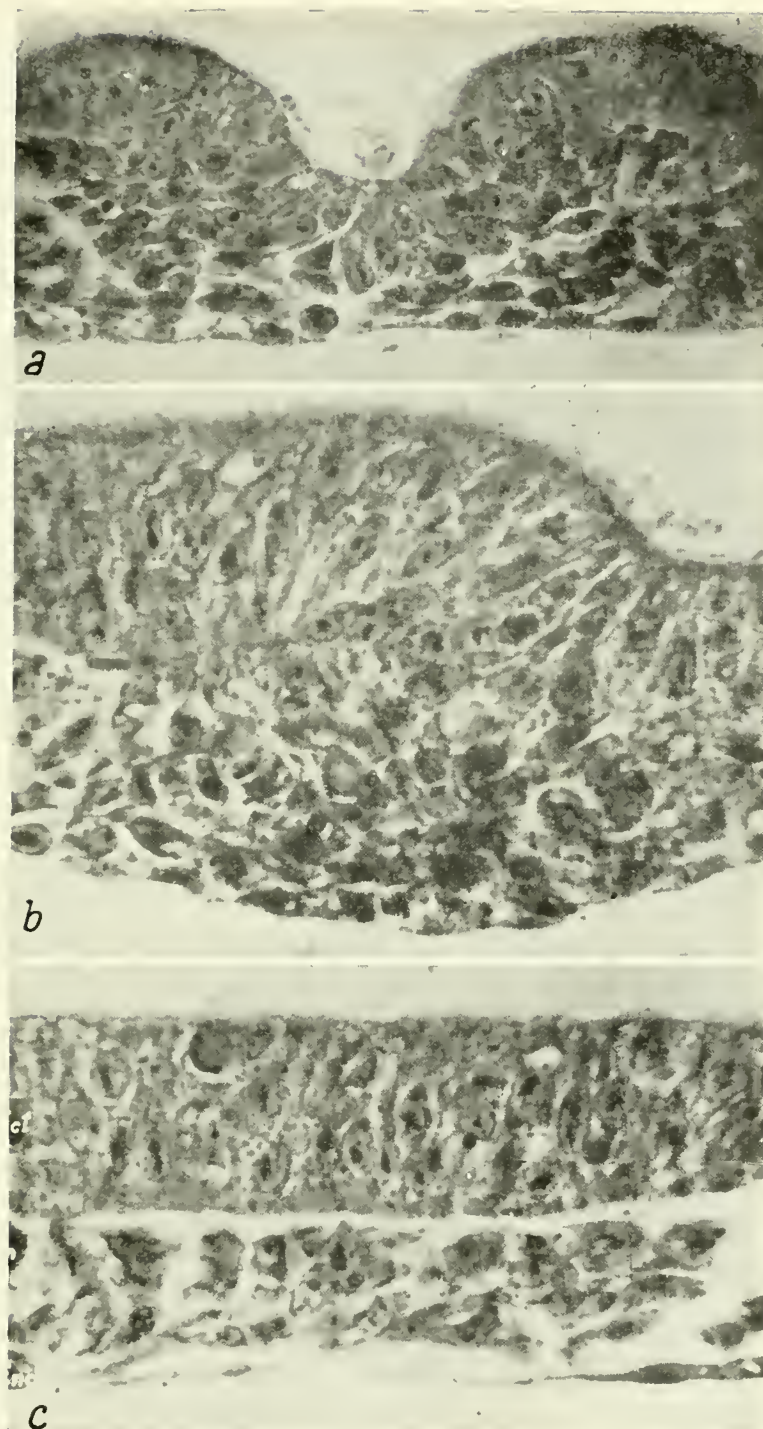


Fig. 126. — (*a*, *b* și *c*) — Secțiuni prin placa embrionară de 24 de ore de incubație. Detalii ca în figura 125. Șanțul primitiv. Regiunea liniei primitive. Ecto- mezo- și endodermul; ectodermul conține elemente viteline.

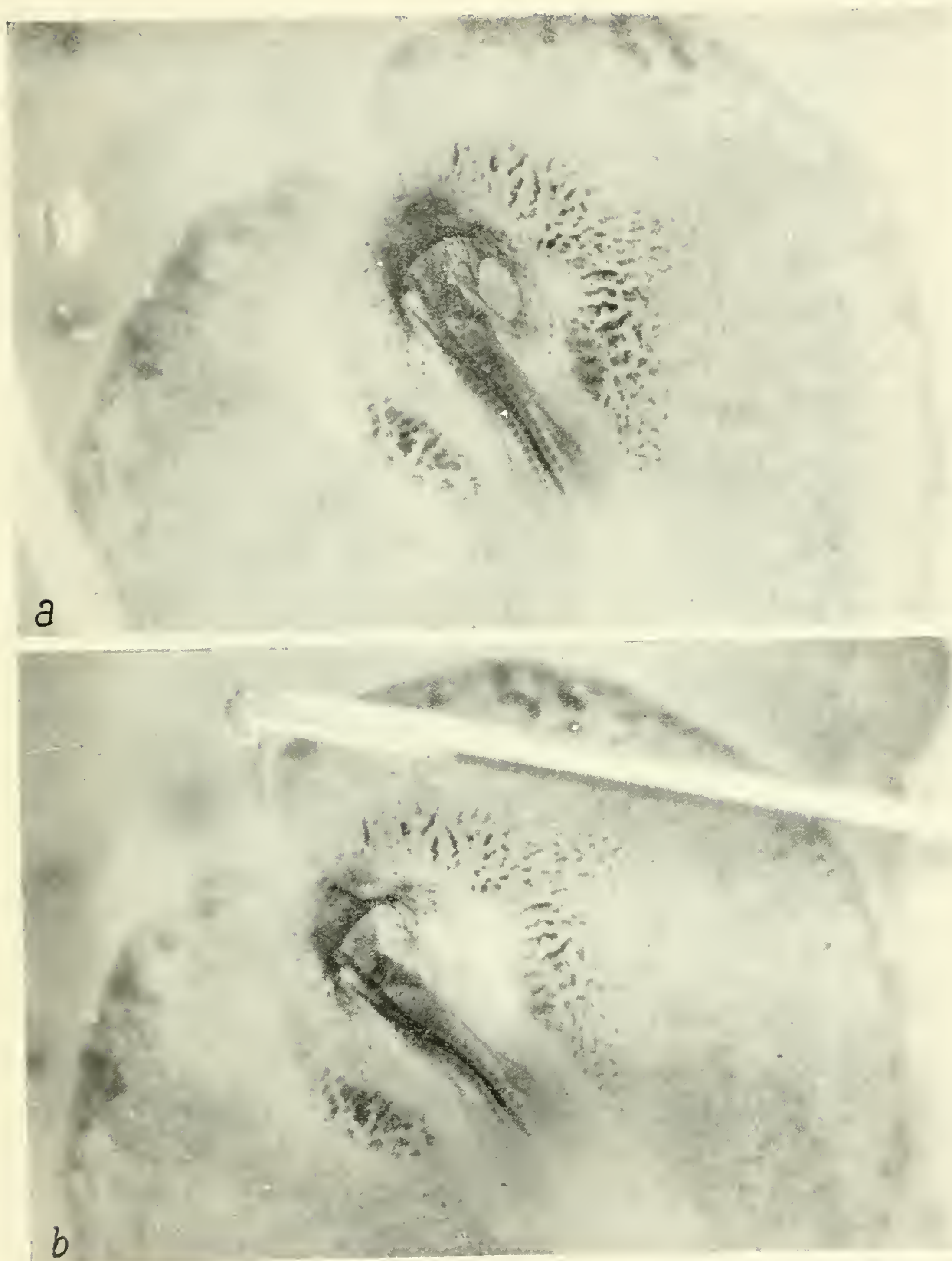


Fig. 127. — Embrion de 48 de ore de incubaţie. Coloraţie vitală cu albastru de Nil. Fotografie pe viu. *a*) Începutul torsiunii capului. Cuta amniotică craniană; vezicula otică (celelalte amănunte ca în figurile 120 şi 121). *b*) Aceeaşi imagine cu instrumentul operator.



Fig. 128. — Placa embrionară de circa 35 de ore de incubaţie. Preparat total, reacţia pseudoperoxidazelor (benzidină, apă oxigenată), glicerină. Aria opacă, aria pelucidă; aria embrionară. În ţinutul ariei opace, insulele sanguine Wolff-Pander evidenţiate graţie reacţiei pseudoperoxidazelor.



Fig. 129. — Legenda ca în figura 128.

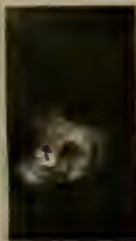


Fig. 130. — Embrion în a patra zi de incubație.



Fig. 131. — Embrion în a cincea zi de incubație.

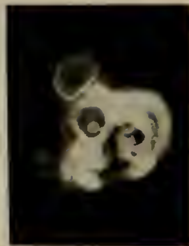


Fig. 132. — Embrion în a șasea zi de incubație.



Fig. 133. — Embrion în a șaptea zi de incubație.



Fig. 131. — Embrion în a opta zi de incubație.



Fig. 135. — Embrion în a noua zi de incubație.



Fig. 136. — Embrion în a zecea zi de incubație.



Fig. 137. — Embrion în a unsprezecea zi de incubație.

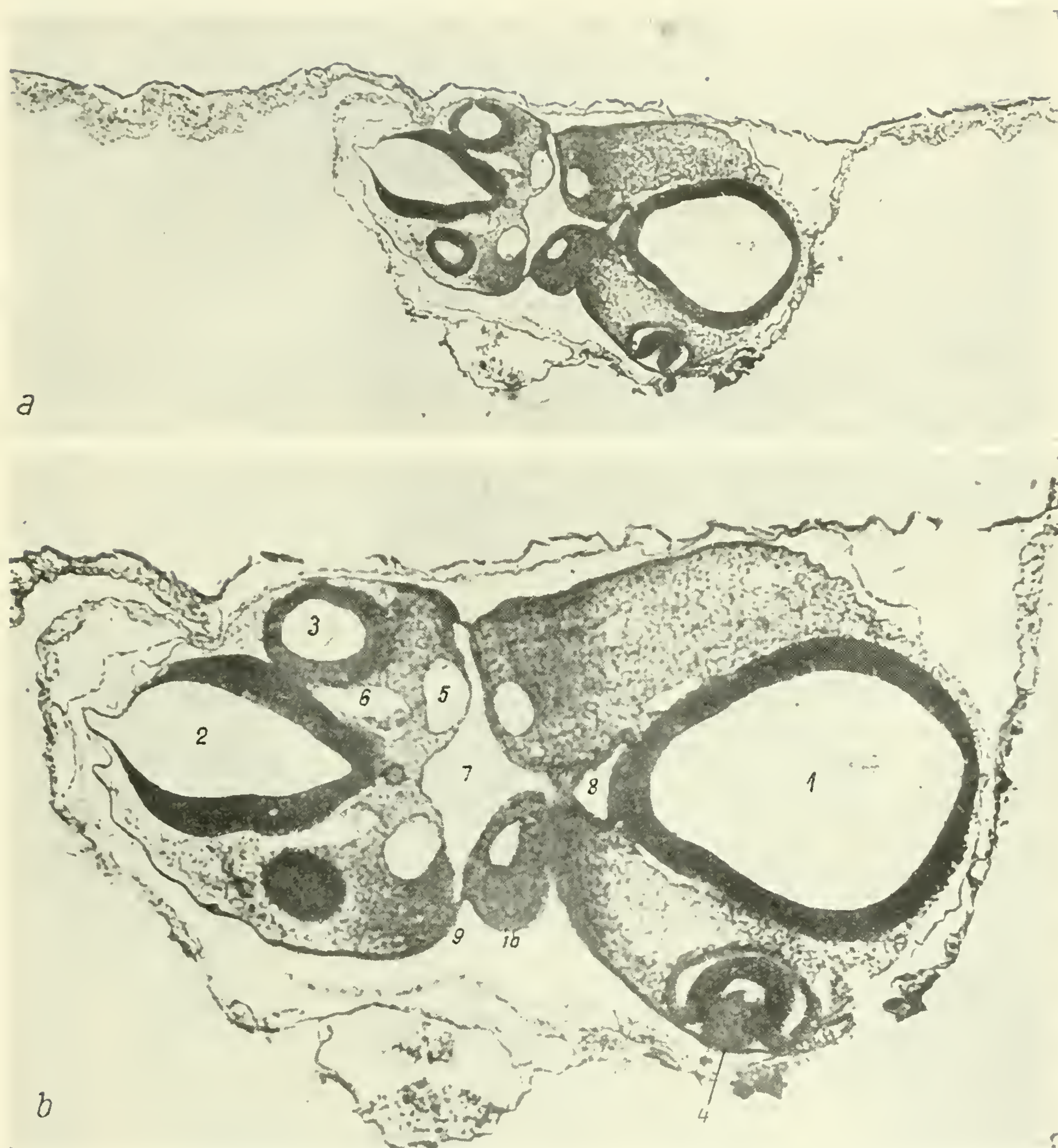


Fig. 138. — *a* — A treia zi de incubaţie. *b* — Aceeaşi secţiune mărită.

1 Prosencefal; *2* — rombencefal (vezi tavanul lui subţire); *3* — vezicula auditivă; *4* — cupa optică; *5* — arcuri branhiale arteriale; *6* — vena cardinală anterioară; *7* — faringe; *8* — hipofiza; *9* — fanta branhială 1; *10* — arcul branhial 1; ecto-, mezo- şi endodermul vitelin extraembrionar; amniosul; membrana seroasă.



Fig. 139. — *a* — Embrion de găină. Începutul celei de-a treia zile de incubaţie. Secţiune transversală prin partea mijlocie a trunchiului duce în celomul extraembrionar ; *b* — Aceeaşi secţiune mărită.

1 — Tubul neural ; *2* — somitele ; *3* — coarda ; *4* — corpul Wolff ; *5* — aorta ; *6* — ectodermul ; *7* — endodermul ; *8* — celomul intra şi ; *9* — extraembrionar ; *10* — vase viteline ; *11* — cute amniotice ; *12* — membrana vitelină.

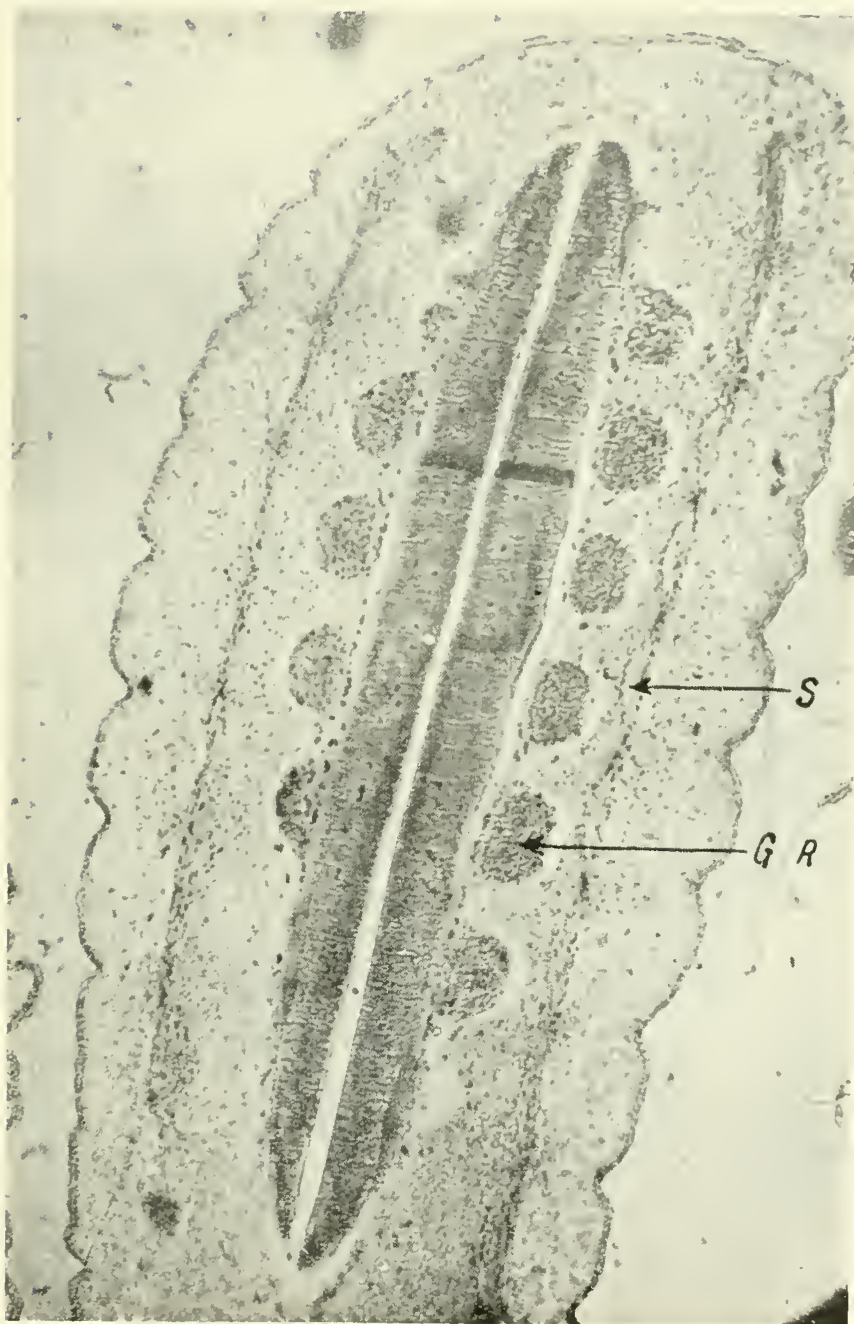


Fig. 140. — Secţiune longitudinală prin tubul neural (impregnaţie argentică). Canal ependimar; ganglion rahidian (*G. R.*); somite (*S*).



Fig. 141. — Sfîrşitul celei de-a patra zile de incubaţie. Impregnaţie argentică. Secţiune parasagitală.

1 – vezicula auditivă; *2* – rombencefalul; *3* – ductul endolimfatic; *4* – complexul acusticofacial; *5* – ganglion petros (glosofaringian); *6* – ganglion nodos (vag); *7* – măduvă; *8* – coarda; *9* – simpatic; *10* – vena cardinală superioară; *11* – atriu; *12* – membrul superior; *13* – ochiul; *14* – hipoglosul; *15* – arcul branhial I; *16* – fanta branhială 1; *17* – arcul branhial II; *18* – fanta branhială 2; *19* – arcul branhial III; *20* – fanta branhială 3; *21* – arcul branhial IV; *22* – fauta branhială 4; *23* – amnios.

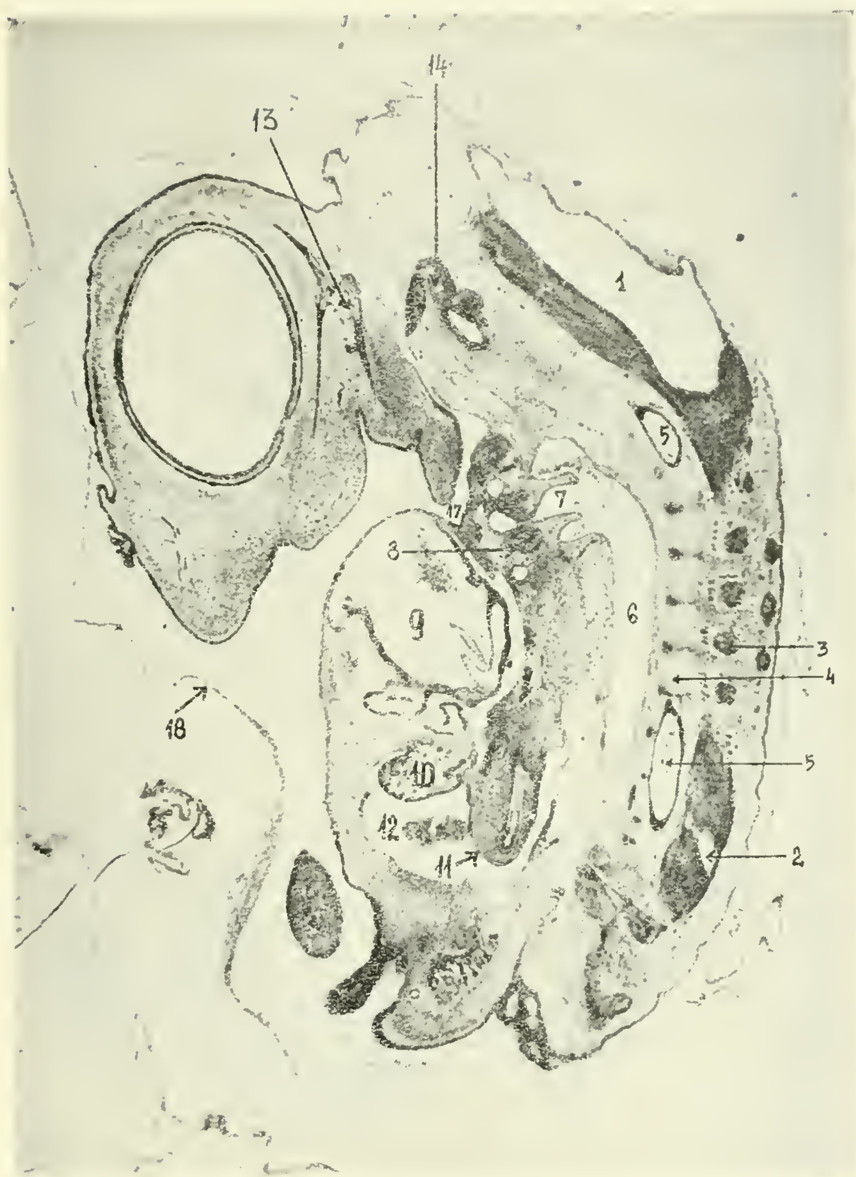


Fig. 142. — Sfîrşitul celei de-a patra zile de incubaţie. Secţiune sagitală, impregnaţie argentică.

1 — rombencefal; *2* — măduvă; *3* — ganglion rahidian; *4* — sclerotom; *5* — coarda; *6* — aorta; *7* — arcurile aortice 3, 4, 6; *8* — tiroida; *9* — atriu; *10* — ficat; *11* — plămîn (bronşie principală); *12* — celom (cavitate pleuroperitoneală); *13* — n. trigemen; *14* — complex acusticofacial; *15* — vezicula auditivă; *16* — arcuri branhiale 1 2; *17* — sinus bucal; *18* — amnios.

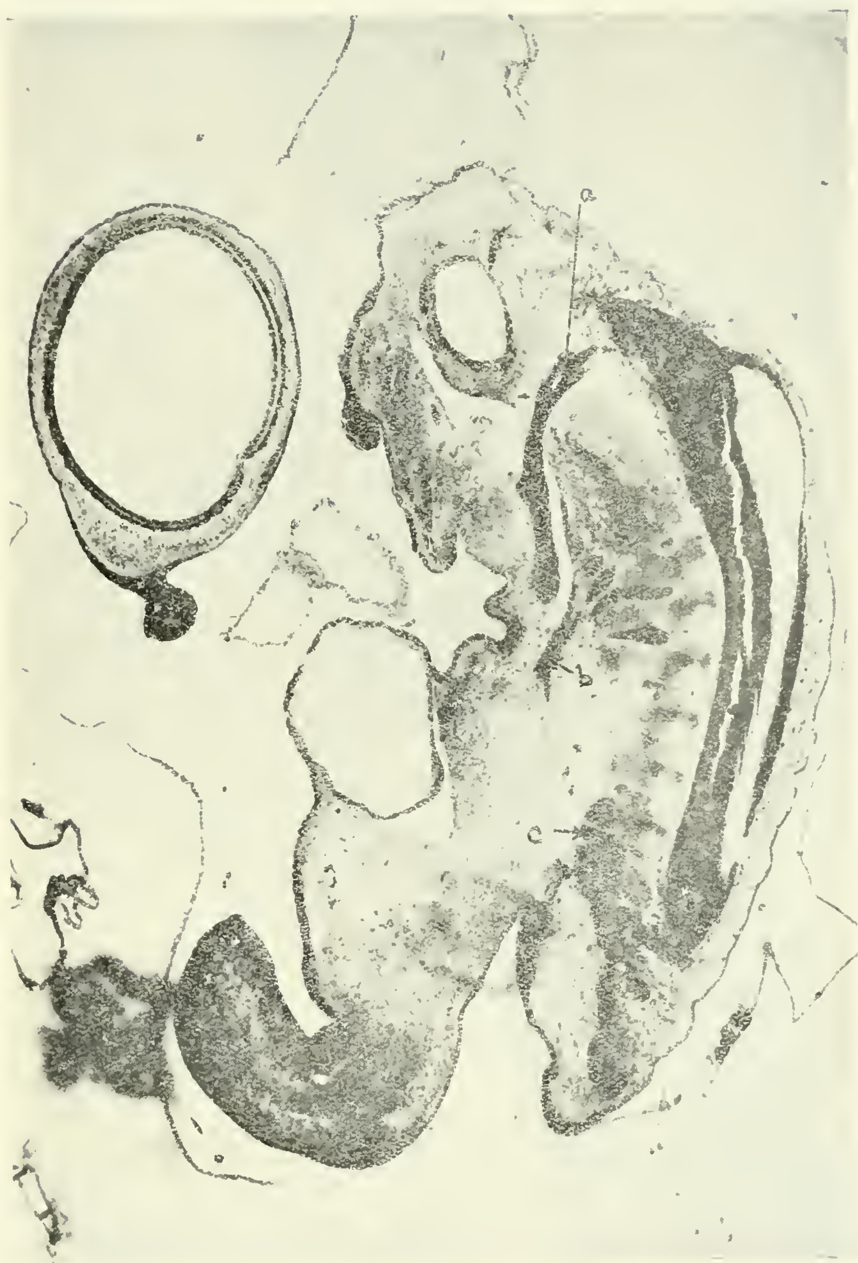


Fig. 143. — Sfîrşitul celei de-a patra zile de incubaţie. Secţiune sagitală, impregnaţie argentică. Indicaţii ca la figura precedentă.

a — complex spinal-vag; *b* — n. hipoglos; *c* — ramura anterioară a nervului spinal.

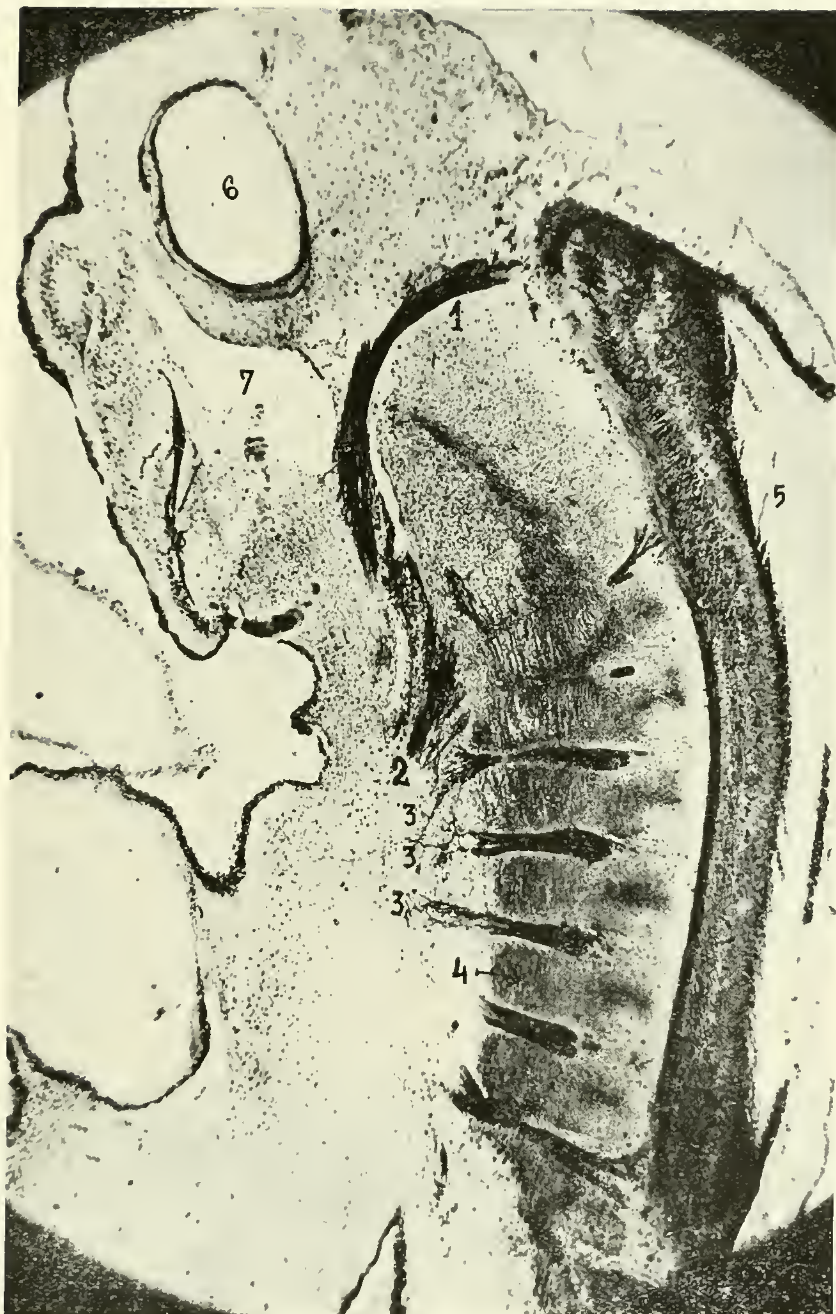
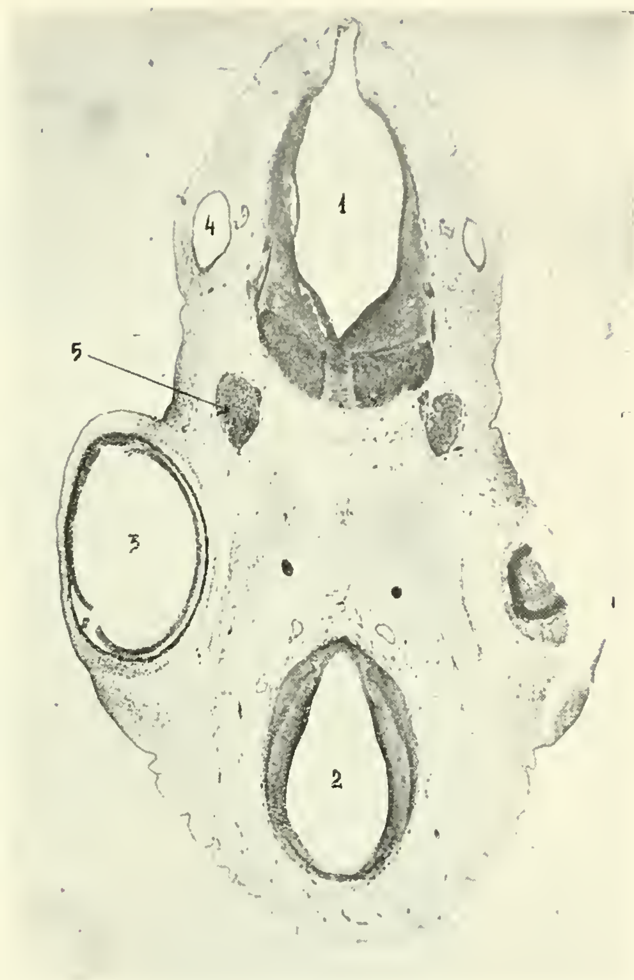


Fig. 144. — Sfîrşitul celei de-a patra zile de incubaţie. Secţiune sagitală. Impregnaţie argentică.

1 — spinalul; *2* — rădăcinile aparente ale hipoglosului; *3* — ramurile anterioare ale nervilor rahidieni cu ramificaţiile lor tegumentare; *4* — somite; *5* — rombencefal; *6* — vezicula auditivă; *7* — vena cardinală anterioară.

Fig. 145. — Secţiune transversală prin capul embrionului de găină în a şasea zi de incubaţie (impregnaţie argentică).

1 — rombencefal; *2* — prosencefal; *3* — ochiul; *4* — vezicula auditivă cu ductul endolimfatic; *5* — ganglionul Gasser.



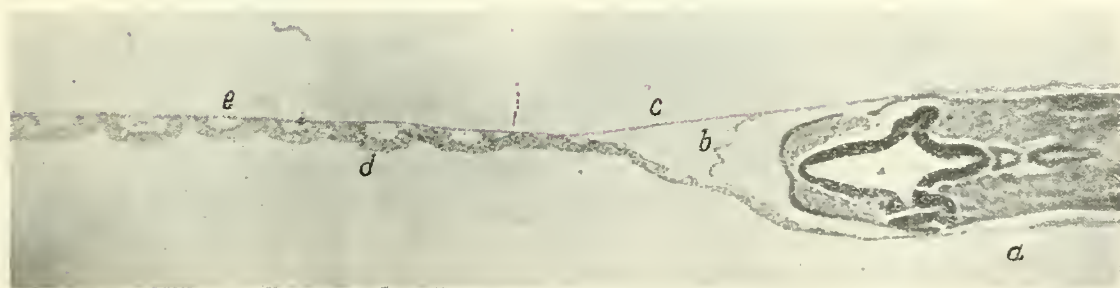


Fig. 146. — Secţiune prin embrionul şi membranele extraembrionare adiacente la 50 de ore de incubaţie.

a — corpul embrionului; *b* — amnios; *c* — membrana seroasă; *d* — endodermul vitelin cu vasele viteline şi ectodermul extraembrionar (*e*).

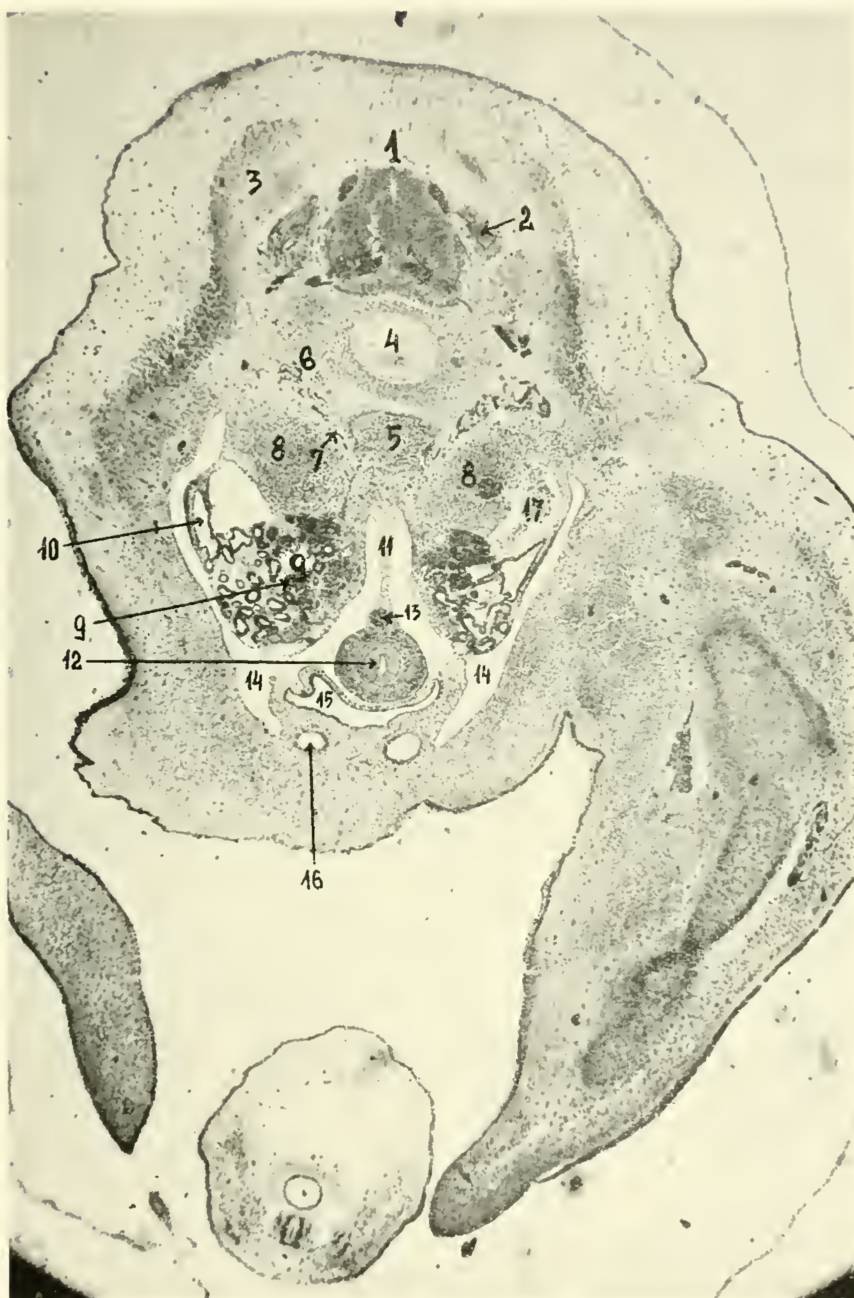


Fig. 147. — Secţiune transversală la nivelul membrelor inferioare prin corpul embrionului de găină în a şasea zi de incubaţie (impregnaţie argentică).

1 — măduva; *2* — ganglionul rahidian; *3* — somită; *4* — coarda; *5* — aorta; *6* — simpaticul; *7* — ramuri spre plexul periaortic şi spre glanda suprarenală; *8* — primordiul metanefrosului; *9* — mezonefrosul; *10* — canalul Wolff; *11* — mezenter; *12* — intestin subţire; *13* — ganglion simpatic mezenterial; *14* — celom; *15* — alantoida (pedicul); *16* — artera ombilicală; *17* — vena cardinală posterioară.

PARTEA A II-a

CERCETĂRI ASUPRA DEZVOLTĂRII REACTIVITĂȚII EMBRIONULUI ȘI A ANEXELOR SALE

CONŢINUTUL

1. *Consideraţii generale asupra reactivităţii.* Formele reactivităţii : legătura dintre reactivitatea de interacţiune şi ontogeneza embrionară, reactivitate prin solicitare directă şi indirectă.

2. *Cercetări asupra fagocitozei la embrionul de găină.* Importanţa teoriei „Fagocitelle." a lui I. Mecinikov pentru înţelegerea legăturii dintre reactivitate şi ontogeneză. Funcţiile endodermului vitelin. Digestia intra- şi extracelulară la nivelul entodermului vitelin. Injecţii de tuş diluat în spaţiul subembrionar. Injecţiile de tuş diluat în cavitatea celomică. Injecţii de tuş diluat în cavitatea amniotică, în cavitatea alantoidiană. Injecţii interstiţiale de tuş în corpul embrionului. Injecţii intravasculare de tuş. Reacţia membranei corion-alantoidiene în prezenţa tuşului diluat sau a altor suspensii corpusculare. Despre incluziile lipidice ce se găsesc în mod normal în citoplasma epiteliilor extraembrionare. Cercetări asupra fagocitozei pigmentului propriu la embrionul de găină aparţinînd raselor pigmentate. Fagocitoza pigmentului în ţesuturile hibride obţinute prin metoda transplantării interrasiale sau interspecifice. Fagocitoza ţesuturilor embrionare observate în cultura de ţesut. Fagocitoza pigmentului în cultura de ţesut a tegumentului embrionar. Fagocitoza tuşului în cultura de ţesut de : tegument embrionar, de membrană corion-alantoidiană, de mezenchim al diverselor regiuni ale corpului embrionar. Fagocitoza microorganismelor la embrionul de găină.

3. *Cercetări asupra reacţiilor hiperplastice ale epiteliului corion-alantoidian şi ale epiteliului tegumentar al corpului embrionului.* Consideraţii asupra diferenţelor de reactivitate înăuntrul complexului embrionar. Comportarea celulelor tumorale heterospecifice în corpul embrionului şi pe corion-alantoidă. Reactivitatea corpului embrionar şi a membranei corion-alantoidiene faţă de heterotransplante de tegument. Reactivitatea corpului embrionului şi a membranei corion-alantoidiene faţă de bacilul Koch.

4. *Cercetări asupra dezvoltării şi reactivităţii sistemului nervos.* Experienţe cu distrugeri localizate în sistemul nervos central. Distrugeri de vezicule cerebrale (decapitări, „embrionul bulbar"). Distrugeri localizate ale originilor reale ale unor nervi cranieni. Modificări şi distrugeri localizate ale măduvei spinării. Despre relaţiile sistemului nervos central cu periferia inervată. Tipul de ontogeneză (nidicol-nidifug) şi procesele de diferenţiere. Cercetări asupra dezvoltării ontogenetice a interrelaţiilor dintre sistemul nervos şi ţesuturile (respectiv organele) inervate la embrion.

CONSIDERAŢII GENERALE ASUPRA REACTIVITĂŢII

Este uzual de a distinge trei moduri de reactivitate: celulară, umorală şi neuro-umorală.

Dacă luăm în considerare substratul care reacţionează, rezultă că toate aceste forme ale reactivităţii sînt de fapt celulare (sau eventual ale substanţei vii necelulare). Agenţi umorali pot fi secretaţi de celule; influxul nervos ia naştere şi se propagă în celule sau în structuri, avînd valoare morfologică şi funcţională celulară sau derivînd din celule.

Ceea ce deosebeşte „reactivitatea celulară" de celelalte moduri de reactivitate nu este deci substratul care reacţionează, ci formele sau mijloacele reacţiei.

Un criteriu important pentru caracterizarea formelor reactivităţii este raportul care se stabileşte între agentul excitant şi substratul excitat care reacţionează.

Dacă excitantul acţionează nemijlocit asupra substratului, putînd suferi (în unele cazuri) direct consecinţele reacţiei acestuia, ne găsim în domeniul unei reactivităţi prin solicitare directă.

În condiţiile organizării metazoarelor dar şi la protozoare se dezvoltă reactivitatea indirectă, cu modalităţile ei umorale şi neuro-umorale, subordonind şi depăşind reactivitatea directă. Aci excitantul iniţial nu mai trebuie să vină în contact direct cu toate substraturile excitate.

Prin difuziunea umorilor sau prin influxul nervos (sau pe cale neuro-umorală), organismul întreg poate fi afectat de un prim excitant iniţial. Aci sfera de acţiune, rapiditatea transmiterii la distanţă şi eficacitatea procesului reacţional în organismul întreg deosebesc reactivitatea „indirectă" de cea „directă".

Şcoala pavlovistă a demonstrat că rolul precumpănitor pe care-l capătă sistemul nervos în filo- şi ontogeneza reactivităţii constă în dezvoltarea treptată a funcţiilor de integrare şi în mijlocirea principală a legăturilor organismului cu mediul.

Metabolismul general şi local (conţinutul „intern" al proceselor morfogenetice) trece din ce în ce mai mult sub controlul şi influenţa sistemului nervos.

Între părţile constitutive ale complexului embrionar [1]) se dezvoltă interacţiuni, din care izvorăsc forţele motrice actuale ale procesului de dezvoltare individuală. Aceasta înseamnă că fiecare parte a organismului embrionului răspunde (în mod foarte diferit

[1]) Complex embrionar = părţile care compun corpul embrionului, împreună cu mediul său apropiat şi îndepărtat, cu care se stabilesc raporturi de interacţiune.

pentru fiecare parte) la influențele celorlalte părți, reacționează la aceste influențe, participînd astfel la procesul de dezvoltare, dar în aceeași măsură partea care a reacționat devine, în rîndul ei, un excitant nou pentru dezvoltarea celorlalte părți.

Rezultatul acestor complicate interacțiuni poate fi deci considerat, din acest punct de vedere, ca un efect al reactivității directe și indirecte a părților constitutive ale complexului embrionar (*reactivitate „de interacțiune"*).

Formele acestor reactivități, raza lor de acțiune și efectele lor se schimbă cantitativ și calitativ pentru fiecare parte a organismului embrionar, în timpul parcurgerii treptelor de dezvoltare individuală.

Sîntem îndreptățiți să căutăm în ontogeneza embrionară o succesiune și o diferențiere a modurilor de reactivitate, începînd cu formele elementare, asemănătoare celor prezente la protozoare (mișcări celulare, fagocitoză, digestie intracelulară, excitabilitate protoplasmatică etc.), mergînd pînă la formele superioare.

Din cele spuse reiese legătura dintre interacțiunea constituenților din complexul embrionar, reactivitatea lor și însuși procesul ontogenetic.

Putem considera, din acest punct de vedere, întregul proces ontogenetic embrionar — sub aspectul său funcțional și morfologic — ca expresia reactivității constituenților vii ai embrionului și organelor sale anexe, extraembrionare, care se dezvoltă într-un sistem complex de interelații în continuă transformare.

Pe baza concepției lui I. M e c i n i k o v, care a pus reactivitatea la baza apariției primelor trepte filogenetice — îndeosebi a trecerii de la protozoare la metazoare — cercetarea reactivității componenților complexului embrionar devine un mijloc de analiză a procesului ontogenetic[1]).

CERCETĂRI ASUPRA FAGOCITOZEI LA EMBRIONUL DE GĂINĂ

Un loc deosebit de important îl ocupă, în opera lui I. I. M e c i n i k o v, concepția sa asupra legăturii dintre modul de nutriție prin fagocitoză și digestia intracelulară și filogeneza metazoarelor inferioare (spongieri și celenterate).

Combătînd teoria gastreei a lui H a e c k e l, care ridica modul de formare al endodermului prin invaginație (gastrulație) la rangul unui principiu general filo- și ontogenetic, stînd la baza apariției organizării metazoarului bistratificat, M e c i n i k o v demonstrează — spre deosebire de concepția lui H a e c k e l — că, acolo unde ea apare, gastrulația reprezintă numai sfîrșitul unei serii lungi de procese evolutive, rezultat al unor transformări treptate, ale căror origini trebuie căutate în reactivitatea primordială directă a protozoarelor flagelate[2]).

Cum este cunoscut, pentru I. M e c i n i k o v, protozoarele flagelate coloniale reprezintă punctul de plecare al dezvoltării filogenetice a metazoarelor (metazooflagelații).

---

[1]) A. B. T o k i n a insistat recent, dezvoltînd moștenirea științifică a lui I. I. M e c i n i k o v, asupra legăturii dintre însușirile imunologice și procesele morfogenetice la embrion, îndeosebi în faza preneurală.

[2]) Mișcările morfogenetice descoperite de W. V o g t pe suprafața blastulei și a tinerei gastrule la amfibieni prin metoda „marcării" demonstrează primordialitatea migrărilor celulare în procesul de gastrulație. Cercetările lui H o l t f r e t t e r asupra comportării blastomerelor în timpul gastrulației completează aceste date.

Se știe că flagelatele se pot transforma în anumite condiții într-o formă amiboidă fagocitantă. La forme coloniale, de exemplu la *Protospongia haeckeli*, studiată de M e c i n i k o v, este evidentă migrația elementelor celulare, care aveau la început structură monadoidă (flagelată), în interiorul coloniei, luînd forma amiboidală. Aceste elemente se specializează pentru funcția de digestie intracelulară, constituind după M e c i n i k o v „fagocitoblastul", spre deosebire de celulele rămase la periferia coloniei, care și-au păstrat structura și funcțiile formelor flagelate, și care formează „knoblastul".

Prin metoda „marcării" cu coloranți vitali, V o g t și G o e r t t l e r au demonstrat existența unor mișcări celulare, curente de grupe de celule, care intră în constituția suprafeței externe a blastulei sau a tinerei gastrule. Gastrulația apare astfel și la embrionii vertebratelor, cercetată din acest punct de vedere, ca rezultatul unor migrații de grupe celulare.

Embriologia comparativă cunoaște de altfel (cercetările lui I. I. M e c i n i k o v asupra dezvoltării meduzelor), pe lîngă forma „pură" de gastrulație prin invaginație (relativ rară) o serie de alte forme : imigrație, delaminare etc. „Din acest punct de vedere, endodermul trebuie interpretat ca o sumă de celule care la început s-au format din blastulă prin imigrare sau desprindere și care s-au aglomerat într-o grupare de elemente amiboide a cărei dezvoltare este variabilă". „Cavitatea gastrică, ca și orificiul bucal, trebuie considerate ca formațiuni recente, care s-au fixat prin intermediul procesului de scurtare a dezvoltării embrionare și au condiționat formarea definitivă a gastrulei" (I. I. M e c i n i k o v, Cercetări asupra dezvoltării meduzelor).

În dezvoltarea sa ontogenetică, acest organism multicelular prezintă deci o diferențiere morfologică strîns legată de solicitarea unor forme primare „directe" ale reactivității. Celulele exterioare (ectodermice), dezvoltînd funcția motorie și de apărare, celulele interioare endodermice (fagocitoblastul) se diferențiază în direcția fagocitozei, digestiei intracelulare, secreției de fermenți în vacuole digestive intracitoplasmatice (teoria „fagocitellei". 1886).

Valoarea teoriei fagocitellei constă în faptul că ea ne înfățișează forțe motrice concrete ale dezvoltării filogenetice legate de funcții impuse de condițiile mediului. Teoria explică treapta de organizare superioară, saltul calitativ, spre organismul metazoar, din ansamblul funcțiilor elementare ale protozoarelor, ca fagocitoza, digestia intracelulară, mișcarea amiboidală, secreția de fermenți etc.

Aceste funcții de bază constituie elementele reactivității celulare directe.

Dacă aceste forme ale reactivității își au astfel importanța lor pentru înțelegerea progresului filogenetic, sîntem îndreptățiți să le căutăm ca factori ai procesului ontogenetic și în primele stadii ale dezvoltării individuale (și chiar mai tîrziu) și este justificată ipoteza de lucru asupra unei strînse legături între manifestarea funcțiilor de nutriție și morfogeneza precoce a embrionului și a anexelor sale [1]).

Printre primii autori care au cercetat funcțiile endodermului viteal embrionului de pasăre trebuie citat R. V i r c h o w, care a demonstrat (1892) că endodermul vitelin este locul principal de primire și prelucrare a substanțelor embriotrofice (vitelus) de către formațiunile embrionare cu structură celulară (V. M î r z a).

Dacă sediul acestui important proces a fost astfel stabilit, trebuie clarificat și modul de folosire a vitelusului (respectiv a globulelor viteline) de către endodermul vitelin. F. R e m o t t i (1927) a făcut întinse cercetări asupra modului de transformare și captare a globulelor viteline de către celulele endodermului vitelin. Acest autor

---

[1]) Vezi concepțiile dezvoltate de P. B. T o k i n în recenta sa lucrare „Imunitatea embrionului".

distinge două faze ale acestui proces : faza captării elementelor viteline prin fagocitoză și a transformării globulelor fagocitate în interiorul vacuolelor celulelor endodermice prin digestia intracelulară, și a doua fază, caracterizată printr-o intensă secreție de fermenți proteolitici, lipolitici și glicolitici care difuzează în afara celulelor endodermului în spațiul subembrionar. Acești fermenți realizează o adevărată digestie extracelulară a elementelor viteline. Observăm că asemănător cu ceea ce se petrece în lumina tubului digestiv, această digestie extracelulară necesită cantități relativ mari de apă. Într-adevăr, începînd cu prima zi de incubație se formează spațiul subembrionar, în care se adună lichid. Începînd cu a patra zi de incubație, acumularea apei în spațiul subembrionar ia proporții deosebit de mari și ajunge la un maxim spre a opta zi de incubație, descrescînd apoi în a doua jumătate a perioadei de incubație. Este în afară de orice îndoială că avem de căutat sursa acestei cantități mari de apă în albuș (vezi „Formarea lichidului subembrionar").

Fermenții dizolvați în apa spațiului subembrionar produc, cum s-a spus, liza (viteloliza) unei părți a masei viteline. Substanțele care rezultă din acest proces de viteloliză (digestia extracelulară a vitelusului) sînt absorbite de endodermul vitelin, unde suferă transformări, și sînt trecute apoi în rețeaua vasculară extraembrionară care s-a dezvoltat în strîns contact cu endodermul vitelin, între acesta și ectodermul extraembrionar al ariei opace.

Dar procesul pare a fi și mai complicat. Trebuie să cităm aici lucrările lui Thomas, care a observat în culturi ale endodermului vitelin (explantare), după o inițială fază de digestie și dispariție a rezervelor intracelulare de vitelus, o resinteză a acestuia de către citoplasma celulelor endodermului vitelin.

Endodermul vitelin al embrionului de pasăre ne apare astfel ca un vast organ fagocitant, în care se manifestă forme primitive de reactivitate „directă" (vezi și cercetările acad. V. Mîrza și Popp, *Despre formarea spațiului subembrionar*), și mai tîrziu, pe lîngă aceasta, ca un difuzor de fermenți și ca un absorbant și transformator de substanțe digerate extracelular. În afară de aceasta, endodermul vitelin îndeplinește și funcția de depozit de glicogen, fiind un adevărat „preficat" în această perioadă precoce a dezvoltării.

Dacă Mecinikov a avut fără îndoială dreptate cînd a afirmat că „diferențierea care a condiționat formarea animalelor pluricelulare nu a fost în nici un caz indiferentă în ceea ce privește tipul de nutriție", ne pare justificat să legăm primele fenomene morfogenetice din aria extraembrionară de tipul de nutriție prin fagocitoză și digestia intracelulară (iar apoi de digestia extracelulară) și să vedem în morfogeneză o expresie a reactivității. (Aceste concepții au fost recent dezvoltate de P. B. Tokin în „Imunitatea embrionului").

Încercarea făcută de unii embriologi (Peter), de a despărți așa-zisele „funcții de întreținere" (*Erhaltungsfunktionen*) de funcțiile morfogenetice (*Gestaltungsfunktionen*) nu corespunde concepției materialist-dialectice a dezvoltării.

Pe baza ideilor expuse mai sus și conduși de concepția lui Mecinikov, am întreprins, cu C. Rîmniceanu, M. Deleanu și St. Sandor, o serie de cercetări asupra fenomenului de fagocitoză în diferitele stadii ale dezvoltării embrionului de găină.

Un prim obiectiv al cercetărilor noastre a fost studiul puterii fagocitante a endodermului vitelin începînd cu a doua zi de incubație. Încă din 1902, Schapper, injectînd carmin în spațiul subembrionar, a putut constata fagocitoza granulelor acestui colorant de către celulele endodermului vitelin.

După ferestruirea ouălor în a doua zi de incubație, injectăm cu pipeta sub controlul lupei binoculare, în spațiul subembrionar, o cantitate de tuș diluat. Cantitatea injectată trebuie să fie tocmai suficientă pentru a umple spațiul subembrionar. Embrionul apare, după o injecție reușită, foarte distinct, cu organele sale primitive, albicioase și net vizibile, ca un obiect semitransparent observat pe fond negru. Acest efect ne dispensează de a face colorații vitale ale embrionului, pentru a pune în evidență organele sale. Injecția fiind inofensivă, procedeul poate înlocui, pentru unele cercetări, colorația vitală. Înțeparea blastodermului pentru injectarea spațiului subembrionar se face departe de corpul embrionului, la marginea dintre aria opacă și aria pelucidă. După injecție, embrionii sînt lăsați să se dezvolte mai departe. Noi citim efectul intervenției noastre începînd cu a treia zi de incubație (deci 24 de ore după injecție).

Excizăm, cu ajutorul unui foarfece cu b, embrionul împreună cu aria sa vasculară (secționînd în afara sinusului marginal membrana extraembrionară); scufundăm globul vitelin în soluție cloruro-sodică izotonică, în care porțiunea excizată devine flotantă. Cu o spatulă ridicăm embrionul împreună cu aria sa pelucidă și opacă și îl spălăm cu grijă într-un cristalizor cu soluție cloruro-sodică fiziologică, pentru a-l debarasa de resturile de vitelus liber, de obicei aderente de fața inferioară a formațiunilor embrionare.

După spălare, montăm întreaga formațiune embrionară pe o lamă, pe care o scufundăm apoi într-un vas conținînd formol (o parte formol, patru părți apă). După o fixare de 24 de ore preparatul este clarificat în glicerină și după alte 24 de ore este gata pentru a fi examinat, ca preparat total.

Alte blastoderme au fost fixate (după ce au fost izolate în modul descris) în fixatorul Helly, deshidratate, incluzionate în parafină și secționate în serie.

La examenul cu lupa binoculară al preparatelor totale, clarificate în glicerină, impresionează aspectul „tatuat" al zonei interne a cadrului vitelin, al ariei opace, adiacente ariei pelucide (fig. 148 și 149). Observată la microscop cu obiective puternice și cu ajutorul contrastului de fază, ne putem convinge că, în zona cu aspect tatuat, celulele endodermului vitelin au fagocitat intens tușul. Acesta se află acum în interiorul celulelor, în cea mai mare parte absorbit pe suprafața globulelor viteline, care în această perioadă de dezvoltare (3 zile de incubație) stau în interiorul celulelor endodermului vitelin, ocupînd vacuolele caracteristice ale acestor celule (fig. 150 și 151).

Granulele de tuș nu pătrund în interiorul globulelor viteline, ci sînt dispuse destul de regulat, formînd uneori un strat uniform pe suprafața lor.

Găsim și grămezi de diferite mărimi, formate din granule de tuș adunate în citoplasma celulelor endodermice, deci lîngă globulele viteline (fig. 152).

Fenomenul de fagocitoză descris este net limitat la cadrul vitelin. Celulele endodermului din zona pelucidă, care continuă endodermul vitelin al zonei opace, nu fagocitează. Excepțional găsim cîte un element conținînd grăunțe de tuș, element care însă este totdeauna în același timp și încărcat cu picături lipidice (sau chiar cu elemente viteline) mai mari decît celulele înconjurătoare (fig. 162 și 163).

Examenul ariilor opace secționate ne convinge de situația intracelulară a granulelor de tuș fagocitate. Rezultatul obținut ne întărește convingerea că încărcarea cu globule viteline a endodermului ariei opace se datorește unui proces de fagocitoză.

Ne-a interesat și comportarea sau soarta tușului care a rămas în fundul cavității subembrionare în contact cu elementele viteline, extracelulare.

Spre deosebire de ceea ce s-a putut observa în interiorul celulelor endodermului vitelin, unde, cum s-a spus, s-a produs absorbția foarte regulată a tușului pe suprafața

globulelor viteline, aici tuşul se află neregulat dispus între globulele viteline, nearătînd nici o dispoziţie deosebită care ar putea trăda existenţa unor reacţii ale globulelor viteline în contact cu granulele de tuş.

Lăsînd embrionii injectaţi în a doua zi de incubaţie să se dezvolte dincolo de a treia zi, şi observînd zilnic, prin fereastra oului, membranele extraembrionare (folosind eventual microscopul ultropac), putem regăsi în părţile acestor membrane — apropiate embrionului — cîmpuri tatuate, în care se păstrează tuşul fagocitat. Între timp, cavitatea subembrionară devenind foarte mare şi acumulînd multă apă, restul tuşului injectat se pierde în fundul sacului vitelin, ceea ce împiedică continuarea fenomenelor de fagocitoză la nivelul endodermului vitelin, cu aceeaşi intensitate ca în a doua şi a treia zi de incubaţie. Tuşul fagocitat poate să folosească, de acum înainte, ca un indicator al resorbţiei elementelor viteline pătrunse iniţial în endoderm, elemente care au devenit „marcate".

În legătură cu fenomenele studiate nu pare lipsit de interes un studiu comparativ al raporturilor care se dezvoltă între elementele viteline şi celulele embrionare la diferitele clase de vertebrate.

La oul amfibiilor cu segmentaţie totală, fiecare blastomer „capătă" prin procesul segmentaţiei o „provizie" de plăcuţe viteline. Pînă la începutul stadiului de larvă liberă (mormoloc), fiecare celulă a organismului mai posedă încă o provizie vitelină. Abia cu începutul mişcărilor libere (în mediu) şi al posibilităţii alimentaţiei exogene încep consumul şi dispariţia acestor rezerve viteline din celulele organelor mormolocului. Este interesant că vitelusul dispare întîi în sistemul nervos central, persistînd mai mult în hematiile şi epiteliul intestinal (observaţie făcută cu B. L i t v a c şi Gh. Z a r z ă r ă[1]). Stabilirea începutului funcţiei fagocitare la celulele embrionului de amfibian, în comparaţie cu embrionul de pasăre, ar fi interesantă. Ceea ce embrionul de pasăre (cu segmentare discoidală) trebuie să obţină prin exercitarea unei funcţii bazate pe reactivitatea celulară directă (= înglobarea globulelor viteline în endodermul vitelin), embrionul de amfibian posedă de la început — fără „efort" — pînă în perioada premergătoare stadiului larvar liber (inexistent la embrionul de pasăre) (fig. 153, 154, 155, 156 şi 157).

Trebuie însă menţionat că şi ectodermul discului embrionar de pasăre de 15 ore de incubaţie conţine picături viteline, probabil fagocitate sau repartizate prin procesul de segmentare.

CERCETĂRI CU AJUTORUL INJECŢIILOR DE TUŞ DILUAT ÎN CAVITATEA CELOMICĂ

La embrionul de două zile şi jumătate de incubaţie, cavitatea celomică extra- şi intraembrionară a fost injectată cu tuş diluat (fig. 158). Sub controlul lupei binoculare se urmăreşte pătrunderea tuşului în celomul din partea locului injecţiei şi apoi şi în celomul din partea opusă.

La controlul acestor embrioni, făcut în zilele de incubaţie următoare, constatăm că tuşul injectat formează conglomerate grosolane, situate de-a lungul trunchiurilor vaselor mari viteline, pe suprafaţa miocardului sau a trunchiului arterial, localizare pe care o observăm, constant, în toate cazurile injectate în felul acesta. De jur împrejurul

[1]) Vezi şi lucrările lui P. P. I v a n o v.

conglomeratelor grosolane găsim celule cu aspect histiocitar-macrofagic, încărcate cu granule de tuș.

Rezultate interesante obținem oferind în acelaș timp tușul ectodermului tegumentar și ectodermului amniotic (care îmbracă pe dinăuntru membrana amniotică). Examenul embrionilor cărora li s-au făcut injecții intraamniotice de tuș diluat arată o activitate fagocitantă a epiteliilor de origine ectodermică ale amniosului, pe cînd epiteliul tegumentar al corpului embrionului se arată inapt de a fagocita.

Este interesant că dispoziția granulelor de tuș fagocitate de către elementele epiteliale ale amniosului ocupă în citoplasma acestor celule regiunea în care se află și coroana perinucleară de picături lipidice caracteristică pentru celulele embrionare. Această dispoziție topografică a elementelor fagocitate, identică cu repartizarea picăturilor lipidice, o găsim și în epiteliul seroasei Baer, care are aceeași origine ca și epiteliul ectodermic al membranei amniotice (fig. 159).

Puterea fagocitantă a epiteliilor ectodermice a fost semnalată încă de Mecinikov la celenterate.

Injectat în cavitatea alantoidiană, tușul se regăsește în zilele următoare sub forma unor conglomerate grosolane, fără a fi fagocitat de către epiteliul endodermic alantoidian.

O valoare deosebită pentru studiul fagocitozei țesuturilor embrionare o are metoda injecțiilor interstițiale de tuș.

Începînd cu a patra zi de incubație (eventual chiar mai devreme), cantități mici de tuș pot fi introduse în țesuturile embrionare cu ajutorul pipetei de sticlă.

Regiunea injectată rămîne „marcată" și poate fi observată în zilele următoare. Examenul microscopic al acestor regiuni injectate arată totdeauna un aflux de celule fagocitante, cea mai mare parte de tip macrofagic, care înglobează tușul. În sînul citoplasmei, granulele de tuș fagocitate formează fie conglomerate mari grosolane, umplînd aproape întreaga celulă, lăsînd liber numai locul nucleului, fie aglomerări mai mici, net delimitate, părînd a se afla într-o vacuolă. Celulele fagocitante se pot îndepărta cu încărcătura lor de locul injecției (fig. 160).

Constatăm deci în mezenchimul corpului embrionului prezența unor elemente capabile să fagociteze sau, mai bine-zis, posibilitatea anumitor celule de a se transforma în elemente fagocitante în prezența unui excitant adecvat. Această însușire lipsește însă epiteliului tegumentar, spre deosebire, cum am văzut mai înainte, de epiteliul ectodermic amniotic.

Depunerea pe suprafața membranei corion-alantoidiene a unei suspensii de carmin sau de tuș după o prealabilă traumatizare ușoară a epiteliului și a rețelei vasculare respiratoare provoacă repede aglomerări foarte mari de elemente macrofage în jurul corpilor străini și fagocitarea acestora (fig. 161).

B. P. Tokin și colectivul său din Lenigrad au întreprins la embrionul de găină studiul sistematic al fagocitozei de-a lungul ontogenezei embrionului, folosind ca tehnică introducerea unor corpuri străine. Astfel, A. K. Dondua constată formarea unor simplaști de jur împrejurul corpurilor străine și ulterior apariția unor capsule înconjurătoare, formate de țesut conjunctiv embrionar tînăr. E. B. Kricinskaia a utilizat metoda injecțiilor intravasculare de tuș la embrionul de găină, constatînd fagocitoza în endoteliile vasculare.

Injectarea de tuș diluat la embrionul viu, în cavitatea ventriculară, în aortă, venele cardinale sau alte vene, reușește relativ ușor, permițînd supraviețuirea embrionului. Operația se poate executa cu hemoragii minime, succesul depinzînd de finețea

vîrfului de sticlă al pipetei de injecție. Am putut observa totdeauna aderența imediată a granulelor de tuș injectate de endoteliul vascular al capilarelor intra- sau extraembrionare.

Relativ ușor reușește și injecția cu tuș a canalului ependimar și de acolo a veziculelor cerebrale, intervenție pe care o vom descrie mai tîrziu. În urma unor asemenea injecții am putut constata că numai tavanul subțire al rombencefalului fagocitează, restul epiteliului ependimar neposedînd această reactivitate (fig. 164).

Nu am putut observa pînă acum diferențe de intensitate sau întindere a procesului de fagocitoză, cercetat cu mijloacele descrise, de-a lungul progresului ontogenezei preeclozionale. Cercetări în această direcție sînt în curs.

Celulele fagocitante au, în cea mai mare parte a cazurilor, un aspect foarte caracteristic. Este vorba de celule mari, ovalare sau rotunde, care se disting net de celelalte elemente mezenchimatoase prin conținutul lor în picături rotunde, de natură lipidică, de mărime diferită, foarte refringente, uneori ușor gălbui.

Aceste celule au fost descrise de M a x i m o v (1907 — 1923) și de D a n t c h a k o f f (1909 — 1916) ca celule conjunctive migratoare. După acești autori, originea lor ar fi celulele mezenchimatoase care își retrag prelungirile.

Împreună cu C. R î m n i c e a n u am putut pune în evidență (1948) aviditatea acestor celule pentru coloranții vitali (fig. 165, 166 și 167), majoritatea granulelor refringente colorîndu-se în mod electiv cu roșu neutru sau cu albastru de Nil. Aceste picături se colorează cu Sudan, reduc acidul osmic (însă mai greu) și sînt solubile în alcool sau eter, arătînd astfel natura lor lipidică.

Introducînd în embrion albastru de tripan pe cale sanguină (transalantoidian sau direct), am putut demonstra însușirile coloidopexice față de acest colorant coloidal electronegativ. Celulele studiate prezintă deci o serie de caractere morfologice și funcționale ale macrofagelor. Este important de semnalat că lobulii de țesut gras subcutanat se formează, la embrionul de pasăre, prin aglomerarea acestor celule, care se încarcă progresiv cu picături grase. Aceste aglomerări celulare sînt deservite de o rețea capilară foarte bogată. Am putut observa formarea — în felul descris mai înainte — a lobulilor grași subcutanați și în tegumentul embrionar de porumbel transplantat pe corion-alantoida embrionului de găină. În acest caz este evident că încărcarea grasă a elementelor macrofagice de porumbel, pe cale de transformare în celule grase, nu s-a putut face decît pe socoteala unei gazde de altă specie (fig. 168).

Prezența picăturilor lipidice în elementele fagocitante, migratoare în sînul țesuturilor embrionare, pune problema unei eventuale acumulări, tot prin una din modalitățile mecanismului fagocitozei, a acestor substanțe grase de către celule migratoare, pe lîngă elaborarea lor intracitoplasmatică. Probabil că, în ambele cazuri (fagocitoză, elaborare), macrofagele descrise realizează un transport de substanțe grase înăuntrul corpului embrionului și al membranelor sale.

Aproape toate elementele celulare ale embrionului și anexelor sale conțin picături lipidice. La nivelul celulelor endodermului embrionar al ariei pelucide, al celulelor ectodermice extraembrionare din aria vasculară, aria pelucidă și a seroasei Baer, aceste picături lipidice au o așezare foarte caracteristică, fiind dispuse sub forma unei „coroane" de jur împrejurul nucleului (fig. 159 și 162). O asemenea dispoziție a incluziilor grase găsim și în epiteliul amniotic, unde există însă tendințe spre confluența incluziilor grase, producîndu-se, începînd cu a cincea zi de incubație, o unică picătură mare, foarte caracteristică pentru aceste celule. Proveniența acestor încărcări grase ale celulelor ectodermului amniotic (care formează pătura interioară a membranei amniotice) este încă neclară. Ar putea să

fie vorba de o resorbție, din lichidul amniotic, a unor substanțe provenite din corpul embrionului.

Este interesant că, în cazul fagocitozei granulelor de tuș de către aceste elemente epiteliale, tușul este repartizat în multe cazuri asemănător incluziilor lipidice. Această observație sugerează ideea posibilității existenței în celulele epiteliale a unui mecanism de fagocitoză a picăturilor grase, pe lîngă cel de elaborare intracitoplasmatică, (fig. 169).

Deosebit de interesante sînt cercetările lui M. Chèvremont (1941—1943—1945), care observă, în culturile de țesuturi de organe ale embrionului de găină, transformarea fibroblaștilor în macrofage sub acțiunea colinei. Această substanță ar determina — după Chèvremont o transformare macrofagică atît a celulelor musculare diferențiate cît și a altor elemente, fiind factorul principal al acestui proces. Noi nu am putut observa — adăugînd colină — o creștere a numărului macrofagelor.

În observațiile de pînă acum a fost vorba de evidențierea fagocitozei, atît în legătură cu funcția de nutriție și morfogeneza normală a embrionului, cît și cu manifestarea acestei forme a reactivității în cazul introducerii experimentale a unor corpi străini inerți.

Mecinikov a demonstrat încă de mult rolul fagocitozei în timpul regresului organelor embrionare trecătoare. Acest lucru se poate observa ușor la nivelul mezonefrosului, în ultima perioadă preeclozională, și după ecloziune. Regresul și dispariția parțială a acestui organ embrionar se petrec sub semnul unei distrofii grase a epiteliilor și al fagocitozei masive a elementelor sale devitalizate (aci apar fagocite mici).

B. P. Tokin, în excelenta sa lucrare, *Imunitatea embrionului*, redeschide problema importanței morții celulare în embriogeneză. În legătură cu aceasta trebuie semnalată fagocitoza propriilor elemente vii în corpul embrionului, îndeosebi fenomenul de fagocitoză precoce, care se observă în mod constant în preajma melanoblaștilor de la începutul apariției lor la rase pigmentate. Începînd cu a șasea—a șaptea zi de incubație se observă în tegumentul embrionilor aparținînd raselor pigmentate nidifuge (găini, fazani etc.) apariția melanoblaștilor ramificați. Melanoblaștii provin din crestele ganglionare ale tubului neural (Borcea, D. Shane).

Macrofagele din apropierea melanoblaștilor se găsesc de multe ori încărcate cu granule sau bastonașe de pigment melanic, îngrămădite de obicei în mod tipic (parcă într-o vacuolă digestivă); aspectul seamănă foarte mult cu ceea ce s-a putut observa cu ocazia fagocitozei granulelor de tuș, mai cu seamă în alantoidă (fig. 170, 171, 172, 173, 174 și 175).

Fagocitoza melanoblaștilor de către macrofagi a fost observată încă de Mecinikov iar recent la pești de London-Lancing.

Melanoblaștii ramificați, asemănător clasmatocitelor, pierd unele prelungiri care se găsesc un timp împrăștiate liber în interstițiu, formînd mase rotunde protoplasmatice pline cu granule cu pigment melanic. Aceste formațiuni sînt înglobate de macrofage. Fenomenul se poate observa tot timpul ontogenezei preeclozionale.

Am putut face observația (cu C. Rîmniceanu și M. Deleanu) că acest proces de fagocitoză a pigmentului melanic este mai puțin intens în cazul difuziunii heterorasiale sau heterospecifice de melanoblaști transplantați în tegumentul embrionului de găină Leghorn.

Persistă aci impresia că macrofagele rasei nepigmentate (Leghorn) nu dispun de mijloace suficiente pentru a realiza fagocitoza și transformarea ulterioară a pigmentului înglobat; aceste mijloace sînt însă prezente la macrofagele raselor sau speciilor pigmentate.

O metodă foarte bună pentru studiul fenomenului de fagocitoză a țesuturilor embrionare o constituie *explantarea acestora în cultura de țesut* [1]). Adăugînd mediului de cultură corpuri fagocitabile sau cultivînd tegumentul embrionar conținînd melanoblaști, putem observa vital desfășurarea activității macrofagelor.

Împreună cu M. Deleanu am studiat din acest punct de vedere culturi de țesuturi ale tegumentului embrionar. Rasa donatoare a fost Plymouth-Rock.

La 24 de ore după începutul cultivării tegumentului embrionar al embrionului de găină de rasă pigmentată (în plasmă heparinată + extract embrionar) remarcăm, de obicei, emigrarea din interiorul fragmentului cultivat a unui număr mai mare sau mai mic (acest număr este foarte variabil și depinde de factori pe care nu i-am putut clarifica încă) de macrofage tipice, dintre care o parte sînt încărcate cu pigment melanic, fagocitat încă în interiorul fragmentului de tegument transplantat (fig. 176 și 177). În unele cazuri se poate observa în zona de creștere și o emigrare de melanoblaști și multiplicarea acestora. În aceste condiții, raporturile dintre macrofage și melanoblaști, ca și fagocitarea fragmentelor care se detașează de celulele melanice, pot fi observate și fotografiate vital (fig. 178 și 179).

Macrofagele din zona de creștere a culturii prezintă de multe ori membrane ondulate, sînt mobile și emit pseudopode (Pinociți).

Cultura tegumentului embrionului de rasă Leghorn de 7 zile de incubație, căruia i-am adăugat o suspensie de tuș, prezintă în majoritatea cazurilor, la 24 de ore după începutul cultivării, o intensă fagocitoză a tușului de către celulele macrofage, iar în unele cazuri și de către celulele mezenchimatoase din zona de creștere (fig. 180 și 182) [2]). În cazul dezvoltării unei lame epiteliale (fig. 183) provenită din componenta epitelială, epidermică, a tegumentului în cultură, găsim, în mod obișnuit, tușul fagocitat în interiorul citoplasmei elementelor epiteliale, așezat sub forma unor coroane perinucleare [3]). Efecte asemănătoare le obținem și dacă oferim celulelor grăunțe de caolin, pigment retinian etc. (fig. 185).

Törö observă fagocitoza în culturi de țesuturi cu ajutorul microcinematografiei (Vadasz).

Deosebit de viguros se dezvoltă de obicei în cultură de țesut și partea mezenchimatoasă și partea epitelială a membranei corion-alantoidiene. Cultura acestei membrane dă de obicei o componentă epitelială mai puternic dezvoltată decît cultura tegumentului. Și aici — în cultura corion-alantoidiană — observăm o puternică fagocitoză de către macrofage (fig. 181) și elemente epiteliale (fig. 184).

Din observațiile descrise mai sus reiese deci că fagocitoza apare de la începutul ontogenezei ca o formă de reactivitate a celulelor embrionare, strîns legată de funcțiile de nutriție și de importante procese morfogenetice progresive. Fagocitoza joacă un rol important în procesul de reducere și limitare al materialului celular propriu (procese ontogenetice regresive).

Din primele zile ale existenței sale, embrionul are posibilitatea de a reacționa și împotriva unor corpuri străine introduse artificial sau accidental. Reactivitatea în raport cu funcția de nutriție și funcția „de apărare" este strîns legată la începutul ontogenezei.

---

[1]) Aici trebuie ținut seama de faptul că celulele embrionare cultivate *in vitro* pot recăpăta unele însușiri „vechi", neexistente în condiții normale, cum ar fi capacitatea de fagocitoză etc.

[2]) După Fischer, numai fibroblaștii de origine sarcomatoasă ar fagocita în cultura de țesut, fibroblaștii normali neavînd nici o putere fagocitantă *in vitro*.

[3]) Matsumoto a observat că, *in vitro*, celulele epiteliului cornean (de la broască) fagocitează.

Pe lingă macrofage și elementele mezenchimatoase, endoteliul vascular și unele epitelii sînt fagocitante. Tubul neural nu fagocitează, în afară de epiteliul tavanului rombencefalului (primordiul plexului coroidian).

Nu toate formațiunile complexului embrionar prezintă simultan același grad de reactivitate. Astfel, membranele extraembrionare se arată a fi înzestrate cu o reactivitate directă mai intensă decît corpul embrionului. Vom analiza acest fenomen mai de aproape, în capitolul următor.

BIBLIOGRAFIE

1. Chèvremont L., Comhaire S. et Chèvremont, *Recherches sur le déterminisme de la transformation histiocytaire*, Acta anatomica Helvetica, 1945, t. I, nr. 1–2, p. 95.
2. Crăciun E. C., *La culture de tissus en Biologie expérimentale*, Paris, Masson, 1931.
3. Dantschakoff W., *Über das erste Auftreten der Blutelemente im Hühnerembryo*, Fol. Hematol., 1907, vol 4, supl.
4. Dondua A. K., *Fagoțiternaia i vospalitelnaia reakții na raznih etapih ontoghenezu*, D.A.N., SSSR, 1955, t. 104, nr. 6, p. 942.
5. Fischer A., *Sarkomzellen und Tuberkelbazillen in vitro*, 1927, Arch. f. exp. Zellf., t. 3, p. 389.
6. — *Tuberkulin und Fibroblasten*, Zschr. f. Immunitätsforschung z. exp. Therapie, 1927, t. 26, p. 24.
7. Fonbrune P., *Technique de micromanipulation*, 1949; *Metodi Micromanipulații*, Moscova, 1951.
8. Goerttler K., *Entw.—Geschichte des Menschen*, Berlin, Springer, 1950.
9. Gordon M., a. Lausing W., *Cutaneous Metanophore Eruption, in Joung Fishes during Stages Preceding Melanotic Tumor Formation*, Amer. J. Morphol., t. 73, 1943.
10. Haeckel E., *Prinzipien der Generallen Morphologie der Organismen*, 1906, Berlin, G. Reimer.
11. — *Natürliche Schöpfungsgeschichte*, 1902, Berlin, G. Reimer.
12. Holtfreter I., *Gewebeaffinität, ein Mittel der embryonalen Formbildung*, Arch. exper. Zellforsch., 1939, t 23, p. 169.
13. Ivanov P. P., *Causes Affecting the Organisation of Axial Primordia in the Amphibian Gastrula*, Arch., Anst., 1939, t. 21, p. 180.
14. Kricinskaia B., *Fagoțitarnaia aktivnost endotelia nekotorih organov kurinogo embriona na raznih stadiah razvitia*, Biul. eksp. biol. i med., 1955, nr. 8, p. 57.
15. Matsumoto S., *Demonstration of Epithelial Movement by Use of Vital Staining with Observation on Phagocytosis in the Corneal Epithelium*, J. exp. Zool., 1916, nr. 27, p. 37.
16. Maximov A., *Bindegewebe und blutbildende Gewebe*, în *Handb. d. Mikr. Anat. des Menschen*, Berlin, nr. 2, 1927, p. 274.
17. Mecinikov I. I., *Cercetări asupra digestiei intracelulare la nevertebrate* (*1883*). *Prelegeri asupra patologiei comparate a inflamației* (1892), în *Opere alese de biologie*, Ed. Acad. R.P.R., 1953, p. 177–353.
18. Mecinicoff E., *On the process on hair turning white*, Proc. Roy Soc. London, 1902, nr. 69.
19. Menkes B., Deleanu H., Sandor St. și Elias St., *Cercetări asupra fagocitozei la embrionul de găină*, Studii și cercetări științ., Acad. R.P.R., Baza Timișoara, 1957, An. IV, nr. 1–2, p. 1.
20. Mirza V. D., *Embriotrofia*, partea I, Ed. Acad. R.P.R., 1951.
21. Mîrza V. D. și Popp I., *Geneza cavității subgerminale la embrionul de găină*, în *Lucrările Sesiunii științifice a Secției de științe medicale a Academiei R.P.R. din 22–24 ianuarie 1954*, Ed. Acad. R.P.R., 1955, p. 607.
22. Peter K., *Grundlagen einer funktionellen Embryologie*, Ed. Bios, 1947.
23. Remotti F., *Ricerche fisiomorfologiche sul sacco vitellino del pollo*, Ricerche di morfol., 1927, VII, p. 201.
24. — *Sull'assunzione della riserve grasse durante lo sviluppo embrionale del pollo*, Ricerche di morfol., 1930, t. X, p. 1.
25. Thomas A. I., *La culture prolongée de la paroi de la vésicule ombilicale chez l'embryon de poulet. La culture pure du syncytium entodermo-vitellin*, C. R. Acad. Sci., t. 197, 1933, p. 425.
26. Tokin B. P., *Immunitet zarodișei*, Izd. Leningr. Univ., 1955.
27. Vogt W., *Gestaltungsanalyse am Amphibienkeim mit örtlicher Vitalfärbung*, Roux'Arch. Entw., 1929, vol. 120.
28. Virchow R., Ztschr. f. wissenschaftl. Zoologie, 1892, vol. 53.

CERCETĂRI COMPARATIVE ASUPRA REACTIVITĂȚII EPITELIULUI CORION-ALANTOIDIAN ȘI A EPITELIULUI TEGUMENTAR AL CORPULUI EMBRIONULUI

În acest capitol expunem cercetări întreprinse împreună cu colaboratorii noștri, E. Cotăescu, M. Deleanu și Gh. Oțetea, asupra comportării unor epitelii embrionare de acoperire (epiteliul tegumentar și epiteliul corion-alantoidian), sub acțiunea unei game de excitanți mecanici, chimici și biotici, ca : virusuri, bacterii, țesuturi și organe necrobiotice, țesuturi și organe vii, acestea din urmă constituind adevărate grefe. S-au folosit agenți excitanți biotici care erau din ce în ce mai îndepărtați — ca poziție sistematică — față de gazdă, și anume țesuturi sau organe aparținînd donatorilor de aceeași rasă cu gazda, apoi de altă rasă, de altă specie de pasăre, în sfîrșit, de specii de mamifere.

Am cercetat în continuare țesuturile tumorale maligne, fie de pasăre, fie de mamifere, aflîndu-se prin metabolismul lor atipic dintr-un anumit punct de vedere la extremitatea acestei serii.

La alegerea regiunilor din complexul embrionar destinate a fi supuse acțiunii acestor agenți am fost călăuziți de presupunerea existenței unor eventuale inegalități în reactivitatea formațiunilor embrionare, a corpului embrionar pe de o parte, a membranelor anexe cenogenetice pe de altă parte. Ne întrebăm de fapt dacă epiteliile de acoperire și mezenchimul corpului embrionar, pe de o parte, și cele ale membranelor extraembrionare, pe de altă parte, reacționează asemănător la unul și același agent, într-o epocă dată a procesului ontogenetic sau dacă există diferențe de reactivitate între țesuturile intra- și extraembrionare.

În cercetările de față, împreună cu E. Cotăescu, M. Deleanu și Gh. Oțetea, am pus un accent deosebit pe efectul „agenților" de tipul tumorilor maligne, a căror influență o studiem în condițiile grefei, fie pe membrana corion-alantoidiană, fie pe corpul embrionar. Aceste grefe tumorale, persistînd și dezvoltîndu-se în sînul complexului embrionar, îl vor putea influența prin metabolismul lor caracteristic și vor suferi, la rîndul lor, influența complexului embrionar de-a lungul fazelor ontogenetice la care ele sînt silite să participe.

Reactivitatea epiteliului corion-alantoidian a constituit obiectul multor cercetări prin care s-a pus în evidență plasticitatea acestuia, ușurința de a se transforma într-un epiteliu multistratificat și de a produce chiar globi epiteliali care pot pătrunde în grosimea membranei corion-alantoidiene. Aceste hiperplazii și metaplazii ale epiteliului au fost observate, în primul rînd, sub influența virusurilor cultivate pe corion-alantoidă, cînd se formează cunoscuții noduli albicioși, densificări macroscopic bine vizibile, produse de multistratificarea epiteliului (Mesrobeanu, citat de Levaditi). Dar și alți factori de natură foarte diferită, ca excitanți mecanici, diferite substanțe inerte, coloranți etc., pot produce asemenea efecte.

Împreună cu E. Cotăescu, M. Deleanu și Gh. Oțetea am observat, în asemenea condiții, două tipuri de reacție a epiteliului corion-alantoidian :

1. o simplă multistratificare și îngroșare a epiteliului ;

2. transformarea malpighiană a epiteliului corion-alantoidian, în care se disting, pe lîngă multistratificarea acestuia :

a) apariția unor spații intercelulare traversate de tonofibrile foarte asemănătoare cu cele din stratul spinos al epidermului, și

b) cornificarea straturilor superficiale ale epiteliului îngroșat.

Transformarea nu se oprește însă aci. În unele cazuri apar perle epiteliale, cornificate sau parakeratozice, care pătrund în mezenchimul alantoidian (fig. 186 și 187). Noi am obținut asemenea transformări cu ajutorul unor corpuri străine inerte presărate pe corion-alantoidă, al unor blocuri de agar depuse pe membrană, în urma excitației cu albastru de tripan. Chiar simpla formare a unei camere de aer artificiale, între corion-alantoidă și membrana papiracee, duce — în unele cazuri — la îngroșări mai mult sau mai puțin întinse ale epiteliului, probabil prin infecții care se produc cu această ocazie. Este impresionantă rapiditatea cu care se dezvoltă modificările descrise. Patru zile după începutul acțiunii unui excitant, metaplazia este manifestă.

Acest tip de reacție a epiteliului corion-alantoidian este deci cu totul nespecific. Este clar că, prin această metaplazie, epitelul corion-alantoidian își pierde structura sa adaptată la funcția respiratoare.

Cercetări pe care le-am întreprins asupra circulației sanguine alantoidiene (vezi capitolul „Circulația alantoidiană"), cu ajutorul observației vitale cu ultropacul sau binocularul după colorații vitale sau injecții totale ale vaselor cu tuș, arată contactul deosebit de intim al capilarelor respiratoare cu epiteliul alantoidian. Celulele stratului unic epitelial se mulează în condiții normale pe circumferințele capilarelor, înconjurîndu-le uneori complet. De aici rezultă o dispoziție aproape intraepitelială a rețelelor capilare, aspect care se aseamănă mult cu cel din plămînul de broască.

În cazul metaplaziei, structura legată de funcția respiratoare dispare. Îngroșarea epiteliului — cu pierderea funcției respiratoare — apare ca o reacție de apărare a celui mai periferic strat viu al conținutului oului, stratul care vine în mod obișnuit în contact cu agenții patogeni, care pătrund prin porii cojii și membrana papiracee pînă la epiteliul alantoidian. Această reacție de apărare, filogenetic cîștigată, poate fi privită în aceeași ordine cu prezența în albuș a unui bacteriostatic, lizozimul.

În această ordine de idei prezintă interes cercetarea posibilităților reactive ale straturilor mai profunde, extraembrionare și a înseși țesuturilor corpului embrionar.

Unii cercetători consideră în genere epiteliile de acoperire ca o reacție a substanței vii la diferiți excitanți ai mediului. În acest caz, formarea unui epiteliu de tip malpighian — în locul celui unistratificat normal de pe membrana corion-alantoidiană — capătă o semnificație biologică deosebită.

Această reactivitate cîștigată de un organ cenogenetic extraembrionar, care persistă numai o scurtă perioadă a ontogenezei (în perioada preeclozională de la a patra zi de incubație pînă la ecloziune), fără să participe la viața posteclozională a animalului, constituie o dovadă a variabilității unui organ embrionar, chiar trecător, în contact cu agenții exogeni și a importanței reactivității pentru morfogeneză.

Trebuie să relevăm aci unele observații făcute de noi cu ocazia studiului unor grefe de organe embrionare implantate pe membrana corion-alantoidiană.

Grefarea tegumentului embrionar homeo- sau heterospecific de pasăre reușește ușor pe membrana corion-alantoidiană a embrionului de găină, începînd cu a opta zi de incubație. Tegumentul depus pe epiteliul corion-alantoidian devine, după 2—3 zile, vascularizat de către gazdă; papilele cresc și se diferențiază în mod aproape normal.

În cazul contactului cu o grefă de țesut embrionar care prinde și care aparține aceleiași rase, sau altei rase sau specii de pasăre, observăm în general o integrare în țesutul corion-alantoidian, de cele mai multe ori fără reacții din partea acesteia. Rar se întîlnesc discrete îngroșări epiteliale și mici perle în apropierea implantului.

În cazul depunerii pe corion-alantoidă a unor organe de şoricel (splină, testicul, muşchi), acestea de obicei se necrozează, iar în corion-alantoidă apare întreaga gamă de reacţii nespecifice epiteliale, care merg pînă la cornificare.

Aici structura nouă, deşi anormală pentru locul în care s-a dezvoltat, nu este patologică în sensul propriu-zis al termenului. Structura nouă este prosoplastică, realizînd o treaptă de organizare superioară a epiteliului, care, în alte părţi ale organismului şi în faze ontogenetice mai avansate, reprezintă normalul (epidermul malpighian tegumentar, al unor mucoase etc.).

Iată deci apariţia heterotopă şi heterocronică a unei structuri „normale", sub influenţa unui agent exogen, ca expresie a reactivităţii locale (directe) a unui organ embrionar cenogenetic, care nu participă la viaţa posteclozională.

Aspecte deosebit de interesante am obţinut, împreună cu St. Sandor, după infectarea membranei corion-alantoidiene cu bacilul Koch de tip bovin. În grosimea membranei se formează un ţesut de granulaţie specific, în centrul căruia găsim celule gigante, aşezate de jur împrejurul unei mase necrotice, cazeificate. Epiteliul alantoidian reacţionează prin multistratificare, cornificare şi producerea de mici globi epiteliali, care se pot detaşa de epiderm şi care pătrund, sub formă de insule epiteliale, în grosimea membranei infectate (vezi capitolul următor).

În dorinţa de a studia reacţia epiteliului corion-alantoidian în contact cu grefe care diferă cît se poate de mult faţă de gazdă ca structură biochimică şi metabolism, am întreprins o serie de cercetări cu grefe de tumori maligne.

Am lucrat cu două tumori diferite pe care le întreţinem în laboratorul nostru, şi anume: un sarcom de şoricel alb obţinut cu metilcolantren şi un sarcom Rous de găină (fig. 188).

Folosind aceste materiale de grefă (heterotipice şi homeotipice), constatăm că fenomenele hiperplastice şi metaplastice ale epiteliului corion-alantoidian care se produc în contact cu aceste tumori prezintă o amploare deosebită faţă de ceea ce s-a observat în cazurile relatate mai înainte, ba chiar capătă un aspect cu totul nou.

Patru zile după depunerea pe corion-alantoida de 8 zile a unui fragment — proaspăt prelevat — de sarcom de şoarece, apare (observaţie vitală la oul ferestruit) o convergenţă a vaselor alantoidiene spre grefă. Fragmentul începe să se scufunde în grosimea membranei. Pe cînd porţiunile superficiale, proeminente, ale transplantului se usucă, luînd un aspect granular neregulat, uneori crateriform — chiar devitalizat — marginile şi fundul implantului sînt vascularizate, cu aspect viu. De jur împrejurul implantului, corion-alantoida se îngroaşă, devenind semiopacă. Pe marginea implantului apar uneori fine picături de lichid exsudat din vasele marginale care pătrund în transplant.

Asemenea transplante, examinate histologic la 8 zile după depunerea lor pe corion-alantoidă, prezintă un aspect caracteristic. Pe secţiune, corion-alantoida apare cuprinzînd masa tumorală ca într-o cupă. Straturile superficiale ale implantului tumoral sînt de obicei necrobiotice. Fundul implantului, în contact cu membrana, este însă viu, format din celule sarcomatoase caracteristice, dintre care multe în cariokineză. Acest strat viu al tumorii este bine vascularizat de capilarele care au pătruns din alantoidă şi în care se găsesc eritrocitele embrionului gazdă (fig. 189).

În fundul cupei alantoidiene, în contact cu tumoarea, s-au format — prin hipoplazia epiteliului corion-alantoidian — masive perle epiteliale, în cea mai mare parte cornificate, care delimitează ţesutul tumoral viu de suportul alantoidian. Vasele nutritive ale implantului pătrund printre aceste perle, venind din arterele alantoidiene. Printre

perlele epiteliale pătrunde spre tumoare și mezenchimul alantoidian, care fuzionează cu țesutul interstițial al tumorii.

În toate cazurile examinate sîntem impresionați de simbioza unor țesuturi heterogene, cum sînt cele de pasăre și de tumoare de șoricel. În țesutul tumoral viu se remarcă o ușoară infiltrație cu leucocite eozinofile, venite din gazdă.

Ceea ce atrage însă în mod deosebit atenția noastră în zona de contact a sarcomului cu masele epiteliale cornificate sînt trabeculele epiteliale fine, ramificate sau simple, formînd cuiburi de celule epiteliale care înmuguresc din perlele epiteliale descrise, înaintînd înspre țesutul sarcomatos, amestecîndu-se intim cu el. În unele locuri se formează asemenea perle epiteliale secundare, însă parakeratozice, care rămîn în legătură cu masele epiteliale de la care au pornit prin pediculi foarte fini. Aici sîntem în fața unei proliferări epiteliale care înaintează înspre masa implantului, deci în direcția opusă proliferării nespecifice descrise pînă acum (fig. 190).

Asemenea aspecte de obicei nu le-am găsit în reacțiile epiteliale descrise mai înainte. Acest tip de creștere epitelială apare, conform experienței noastre de pînă acum, mai cu seamă în cazurile de implante tumorale.

Este greu să nu compari aceste trabecule și grupulețe epiteliale, formate din celule plate, în parte keratinizate, cu aspectele obișnuite din epitelioame spinocelulare sau cancroide. Toate aceste formațiuni epiteliale se îndreaptă înspre masa sarcomatoasă, parcă atrasă de ea (fig. 190).

Implante mici tumorale se pot scufunda complet în membrana corion-alantoidiană, înconjurîndu-se cu epiteliul acesteia, care se închide deasupra implantului pătruns. Aceste implante apar încercuite din toate părțile cu perle epiteliale (fig. 189).

Vedem deci că, în cazurile descrise, implantul heterogen (sarcomul de șoarece) a stîrnit, pe lîngă reacția de apărare a epiteliului corion-alantoidian, și o creștere infiltrativă epitelială înspre masa sarcomatoasă.

Aspecte analoge le găsim și în cazul implantării sarcomului Rous pe corion-alantoidă. Și aici se produc, în contact cu tumoarea, o îngroșare a epiteliului și perle epiteliale. Acestea sînt însă, în cazurile noastre, numai parakeratozice, fără cornificări și mult mai mici decît în cazul implantării sarcomului de șoarece. Aici nu se formează masele compacte epiteliale pe care le-am văzut la implantele cu sarcomul de șoarece, ci insulele răzlețe epiteliale sînt distribuite neregulat în masa sarcomatoasă.

Aceste insulițe epiteliale se găsesc de obicei în apropierea trunchiurilor vasculare relativ mari care înconjură implantul. Uneori ele pierd aspectul compact, capătă un lumen, luînd un aspect chistic (fig. 188, 192).

Țesutul sarcomatos propriu-zis este de tip fuzocelular sau reticulat. Există zone dens infiltrate cu eozinofile.

În jurul implantelor — în grosimea membranei corion-alantoidiene — se observă, la oarecare depărtare de implant, dense infiltrate, noduli peri- sau paravasculari, care seamănă cu insule hematopoetice neoformate. Pe mari întinderi, corion-alantoide apare, în aceste cazuri, macroscopic lactescentă, expresia infiltratelor inflamatoare și hematopoetice din sînul ei.

Noi am dezvoltat în laboratorul nostru metodica de cultură „în trei trepte", care ne permite să comparăm comportarea unui transplant în cultură de țesut, pe corion-alantoidă și pe corpul embrionului însuși.

Această tehnică permite evidențierea diferențelor de comportare a unuia și aceluiași țesut (sau organ) în aceste trei condiții.

Aplicînd principiul acestei metode, după ce am studiat comportarea tumorilor pe corion-alantoidă, am trecut la implantarea lor pe corpul embrionului de găină. Transplantarea tumorilor pe corpul embrionului constituie o metodă a oncologiei experimentale încă puțin dezvoltată.

Dacă s-au executat numeroase experiențe cu transplantări de țesuturi embrionare homeo- sau heterogene în organisme adulte sau tinere (în orice caz postnatale), transplantarea tumorilor de la organisme adulte în corpul embrionului, necesitînd o tehnică deosebită, a preocupat în mai mică măsură pe cercetători, ceea ce ar putea explica numărul relativ mic al acestor lucrări existente în literatură. Astfel sînt cunoscute din literatură culturi de țesuturi tumorale pe membrana corion-alantoidiană, în sacul vitelin și, în mult mai mică măsură, încercări de implantări în corpul embrionar.

Această metodă de lucru este însă, din multe puncte de vedere, interesantă. Introducerea unei tumori vii cu specificul ei metabolic și biochimic, în sînul unui organism embrionar, și el în creștere, participarea implantului tumoral la parcurgerea etapelor ontogenetice și transformărilor metabolice legate de acestea, ar putea da informații asupra modului de creștere și de diferențiere a țesuturilor tumorale, pe de o parte, iar pe de altă parte ar putea provoca modificări ale însuși procesului ontogenetic embrionar. Areactivitatea imunologică a gazdei embrionare permite și studiul creșterii implantului tumoral, nestingherit de acțiunea unor anticorpi.

Iată motivele care ne-au determinat să trecem la experiențe cu implantări de țesuturi tumorale în corpul embrionar. În afară de aceasta, am urmărit prin aceste experiențe — după cum am mai spus — să comparăm reacția epiteliului tegumentar și a mezenchimului corpului embrionar cu aceea a epiteliului corion-alantoidian și a mezenchimului lui în contact cu același implant tumoral.

Ne-am folosit de tehnica noastră de mielorahischizis, descrisă în capitolul precedent, și utilizată de noi și pentru grefe de tegument hetero- sau homeospecifice pe corpul embrionului.

La trei zile de incubație se redeschide tubul neural în regiunea membrelor inferioare și fragmentul tumoral — sarcom Rous proaspăt prelevat de la donator — este depus deasupra jgheabului neural redeschis al gazdei.

La un embrion astfel tratat, fixat în a 16-a zi de incubație, se remarcă, exterior, cu ochiul liber, la locul intervenției, o ridicătură la nivelul căreia se vede — prin transparența tegumentului — o masă violacee. Aceasta corespunde — cum se constată pe secțiunile microscopice făcute în această regiune — unui extravazat sanguin juxtatumoral. La examenul seriei de secțiuni făcute prin acest embrion se găsește în derm, deasupra arcului vertebral, un țesut tumoral dens, bine delimitat de mezenchimul înconjurător. La nivelul unei apofize spinoase neînchise, țesutul tumoral invadează canalul rahidian, venind în contact cu măduva (la acest nivel măduva prezintă semnele intervenției chirurgicale) (fig. 191).

Sarcomul Rous diferă aici — în corpul embrionului — întrucîtva de cel cultivat pe corion-alantoidă (fig. 192). Structura este aici mult mai densă, omogenă. Aspectul reticulat lipsește.

Este foarte important că aici, în corpul embrionar, mezenchimul din jurul sarcomului Rous implantat nu prezintă nici un fel de reacție, contrastînd net cu ceea ce se observă în jurul aceluiași sarcom grefat pe membrana corion-alantoidiană, unde se dezvoltă o puternică reacție sub forma infiltratelor leucocitare intra- și peritumorale și a reacțiilor hematopoetice la distanță de implant.

Ceea ce atrage însă în mod deosebit atenția noastră este prezența unei formațiuni epiteliale compacte, în evidentă legătură cu tegumentul embrionar, care pătrunde de la suprafața embrionului pînă în masa sarcomatoasă (fig. 191). Creșterea acestei mase epiteliale este atît de intensă, încît ea începe să proemine la suprafața cutanată a regiunii dorsale. În centrul acestei formațiuni epiteliale hiperplastice, celulele iau un aspect parakeratozic. Multe celule sînt surprinse în cariokineză, fără să se găsească însă aspecte atipice în conformația nucleilor.

În contact cu sarcomul înconjurător, masa epitelială păstrează fie o margine palisadică netă, fie că apar infiltrări ale elementelor epiteliale în țesutul sarcomatos adiacent.

Este important că această reacție epitelială puternică nu s-a produs pe toată întinderea contactului sarcomului Rous cu epiteliul tegumentar al embrionului gazdă; dimpotrivă, trebuie subliniat că fenomenul s-a produs numai pe o mică parte a suprafeței de contact.

Ne putem întreba dacă nu cumva însăși tehnica de introducere a fragmentului tumoral în corpul embrionului (operația de rahischizis la 3 zile de incubație) ar fi putut juca un rol în localizarea reacției epiteliale.

Dispunem însă de preparate de control care provin de la embrioni cu simple incizii ale tubului neural, fără introducere de transplante, sau de la embrioni purtători de implante de tegument embrionar homeo- sau heterorasiale și chiar heterospecifice. În afară de aceasta, avem la dispoziție preparate cu cauterizări ale măduvei spinării pe o întindere de 10 somite.

În nici unul din aceste cazuri nu se poate observa nici cea mai mică reacție hiperplastică a epiteliului de acoperire. Simpla intervenție traumatizantă sau implante de țesuturi sau organe netumorale nu stîrnesc pe corpul embrionului reacțiile epiteliului de acoperire tegumentar, spre deosebire de ceea ce se petrece la nivelul epiteliului corionalantoidian.

Implantarea sarcomului de șoarece (obținut prin acțiunea metilcolantrenului) reușește la fel de bine pe corpul embrionului ca și implantarea tumorii Rous (fig. 193).

Fragmentul tumoral, proaspăt prelevat de la șoarecele donator, se introduce în regiunea dorsală a embrionului de găină, pregătită după tehnica mielorahischizisului, la 3 zile de incubație.

Examinat după 10 zile, epidermul embrionului se arată complet închis deasupra implantului în regiunea operatoare. Tumoarea implantată se dezvoltă viguros, infiltrînd musculatura, țesutul dermic și canalul rahidian.

Celulele neoplazice se infiltrează de-a lungul spațiilor interstițiale, al trunchiurilor nervoase și al vaselor, îndepărtîndu-se uneori mult de masa tumorală centrală. Elementele sarcomatoase de șoarece se disting imediat prin nucleul lor mare, vezicules și citoplasma lor cromofilă, de celulele autohtone, înconjurătoare. Deosebit de interesante sînt unele celule tumorale complet izolate, înconjurate din toate părțile de mediul embrionar. Aceste celule se arată complet integrate morfologic în ambianța lor. Nici o reacție din partea țesutului autohton nu se remarca în jurul lor, ca de altfel nici în jurul tumorii centrale (fig. 193).

Cu această ocazie am putut verifica o observație extrem de interesantă a lui R. Levi-Montalcini și V. Hamburger. Acești autori au reușit să implanteze un sarcom de șoricel la baza membrului inferior al embrionului de găină. Ei descriu o stimulare a creșterii nervilor periferici în contact cu tumoarea implantată și de asemenea o hipertrofie a ganglionilor spinali și simpatici regionali.

Într-adevăr, în cazul nostru, în regiunea ocupată de tumoarea transplantată, trunchiurile nervoase sînt anormal de groase. Ele formează, în unele locuri, adevărate plexuri în sînul masei tumorale. Explicația acestui fenomen trebuie căutată, după părerea noastră, într-o acțiune pe care un surplus de țesut periferic cu activitate mitotică foarte mare și anumite particularități metabolice o exercită asupra trunchiurilor nervoase regionale în creștere.

Pînă acum nu am putut găsi în cazul de implantare a unui sarcom de șoarece — o reacție epitelială a epidermului tegumentar comparabilă cu cea descrisă în cazul sarcomului Rous. Numai într-o zonă restrînsă tegumentară am observat o multistratificare simplă în contact cu țesutul tumoral implantat.

Comparația tumorii originale (înaintea transplantării) cu tumoarea care s-a dezvoltat în corpul embrionului de găină arată o netă creștere a indexului cariokinetic la transplant și de asemenea apariția de multiple monstruozități nucleare, care nu există în tumoarea originară. În comparație cu tumoarea implantată pe corion-alantoidă se remarcă o creștere mai viguroasă în corpul embrionului.

Rezultatele experiențelor descrise pot fi grupate în jurul mai multor probleme.

1. REACTIVITATEA MEMBRANEI CORION-ALANTOIDIENE A EMBRIONULUI DE GĂINĂ

Ea se dovedește a fi alta decît cea a epiteliului ectodermului tegumentar și a mezenchimului corpului embrionar.

Infiltratele care apar în stroma membranei corion-alantoidiene în jurul sarcomului Rous și în mai mică măsură în jurul sarcomului de șoarece, reacțiile hematopoetice perivasculare depărtate de locul implantului Rous, invadarea tumorilor implantate pe corion-alantoida cu leucocite, contrastează cu areactivitatea morfologică a țesuturilor corpului embrionar propriu-zis în contact cu aceleași tumori.

În cercetări încă în curs (vezi capitolul precedent), referitoare la comportarea epiteliului corion-alantoidian în cultura de țesut (explantare), ne-am putut convinge de plasticitatea și creșterea viguroasă a acestui epiteliu în asemenea condiții.

În contact cu un antiser (ser antirinichi de găină), elaborat la iepure, corion-alantoida răspunde printr-o hiperplazie spectaculoasă a epiteliului ectodermic, cu apariția de incluzii intraprotoplasmatice eozinofile, și apoi cu fenomenele de necrobioză. Cercetări încă în curs (E. Cotăescu) indică apariția unor anticorpi în corion-alantoidă, precipitabili prin serul antigen — ser de iepure — introdus în prealabil în ou.

Noi interpretăm acest înalt grad de reactivitate a membranei corion-alantoidiene ca o însușire dobîndită în timpul filogenezei sub acțiunea agenților pătrunși din mediu pînă la membrana corion-alantoidiană. Transformarea malpighiană a epiteliului corion-alantoidian capătă în felul acesta o semnificație biologică deosebită.

2. HIPERPLAZIILE EPITELIALE

Trebuie să distingem între hiperplaziile nespecifice care în cazul implantelor tumorale iau o amploare deosebită — și procesele infiltrative speciale, observate numai în cadrul excitanților tumorali.

Hiperplaziile diferă la implantele de sarcom de șoarece de cele determinate de sarcomul Rous, și în cazul creșterii pe membrana corion-alantoidiană, și în cazul creșterii pe corpul embrionului propriu-zis. În cazul tumorii cu factor etiologic virotic sigur — sarcomul Rous — observăm pe corion-alantoidă formarea unor insule epiteliale parakeratozice prezentînd cariokineze, transformări chistice, iar pe corpul embrionului o puternică hiperplazie epitelială pornind dintr-o regiune circumscrisă a epiteliului tegumentar. În ambele variante experimentale — corion-alantoida și corpul embrionar — există, pe lîngă fenomenele hiperplastice epiteliale nespecifice, și proliferări infiltrative epiteliale speciale, pe care le-am putut observa numai în cazurile de implante tumorale și care nu se produc — conform experienței noastre de pînă acum — sub acțiunea excitanților netumorali.

În cazul implantului tumorii produse cu metilcolantren (sarcomul de șoarece), reacția epitelială a membranei corion-alantoidiene este extrem de puternică, sub formă de globi sau perle epiteliale cornificate și de dezvoltare a unei creșteri infiltrative epiteliale speciale înspre țesutul sarcomatos, producîndu-se un țesut mixt, sarcomatos și epitelial.

Pe corpul embrionului nu se produce însă o reacție însemnată a epiteliului tegumentar (numai o multistratificare locală). În schimb se observă uneori o puternică hiperplazie a nervilor periferici în ținutul invadat de tumoare. Creșterea epitelială specială infiltrativă determinată de ambele tipuri de implante pe corion-alantoidă amintește întrucîtva modul de creștere al epitelioamelor de tip malpighian bazo- sau spinocelular. Aici lipsesc însă atipiile celulare.

Aceste infiltrate epiteliale depășesc caracterul unor simple hipertrofii „de apărare". Ne putem întreba dacă sîntem aci în fața unor efecte de stimulare deosebită a creșterii epiteliale produse de agenți chimici (sau fizici?) emanați din tumoarea implantată, sau dacă procesul hiperplastic produs este efectul unei infecții virotice care provine din țesutul tumoral implantat.

Numeroși autori subliniază (A. B o r r e l, citat de Ș t. N i c o l a u) efectul excitant al virusurilor asupra creșterii epiteliilor, producerea de hiperplazii și de perle epiteliale în cele mai variate organe. După concepția acad. Ș t. N i c o l a u, influența excitantă se manifestă, în cazul virusurilor atenuate, prin efecte de creștere, putînd îmbrăca chiar un caracter neoplazic, iar în cazul acțiunii exacerbate a virusurilor, prin distrugerea țesutului neoformat.

În cercetări viitoare vom dezvolta baza noastră experimentală în acest sens.

3. ASPECTUL CONVIEȚUIRII ȘI INFLUENȚĂRII RECIPROCE A ȚESUTURILOR HETEROGENE

Acestea se realizează în experiențele noastre pe corpul embrionului în perioada observată (pînă la 18 zile de incubație), fără fenomene de reacție mezenchimală din partea gazdei. Această areactivitate a mezenchimului corpului embrionar contrastează cu reacțiile celulare puternice, observate pe membrana corion-alantoidiană. Reactivitatea umorală redusă a embrionului este cunoscută. Posibilitatea de a forma anticorpi pare să apară în plin abia în viața posteclozională a puiului de găină.

Credem că diferențele de creștere și structură ale tumorilor implantate pe membrana corion-alantoidiană și pe corpul embrionului pot fi explicate prin gradele diferite de reactivitate a acestor două medii embrionare. Țesuturile tumorale s-au dezvoltat totdeauna mai viguros în sînul corpului embrionului decît pe membrana extraembrionară.

BIBLIOGRAFIE

1. Campbell J. G., *The Inactivation of Tumours in the Fertile Egg, with Special Reference to Associated Ectodermal Lesions of the Chorio-allantoic Membrane*, Brit. J. of Cancer, London, 1949, t. III, nr. 1, p. 72.
2. Emmert E. W., *The Tuberculostatic Action of Streptothricin with Special Reference to the Action of Streptomycin on the Chorio-allantoic Membrane of the Chick Embryo*, Publ. Health Rep., 1945, t. 60, p. 1415.
3. Emmert E. W. a. Smith M. I., *The Chorio-allantoic Membrane of the Chick Embryo as a Medium for Testing the Virulence of Tubercle Bacilli*, Am. Rev. of Tub., 1943, t. 47, p. 427.
4. Fite G. I. a. Olson B. J., *Infectivity of Mycobacteria for the Chorio-allantoic Membrane of the Chick Embryo*, Publ. Health Rep., 1944, t. 59, p. 1913.
5. Francis J., *The Chick Embryo in Chemoterapeutic Research*, Proc. Roy. Soc. Med., oct. 1946, vol. XXXIX, nr. 12.
6. Gallawan M., *Encephalitis and Meningitis in the Chick Embryo Following Inoculation of the Chorio-allantoic Membrane with H. Influenzae*, Am. J. of Pathol., 1937, t. 13, p. 911.
7. Gallawan M. a. Goodpasture E. W., *Infection of Chick Embryos with H. Pertussis Reproducing Pulmonary Lesions of Whooping-Cough*, Am. J. of Pathol., 1937, t. 13, p. 927.
8. Goldworthy N. E. a. Moppett W., *The Reaction of the Chorio-allantoic Membrane of the Chick to Certain Physical and Bacterial Agents*, J. Pathol. a. Bacteriol., 1935, t. 41, p. 529.
9. Goodpasture E. W., *Some Uses of the Chick Embryo for the Study of Infection and Immunity*, Am. J. of Hyg., 1938, t. 28, p. 111.
10. Goodpasture E. W. a. Anderson K., *The Problem of Infection as Presented by Bacterial Invasion of the Chorio-allantoic Membrane of Chick Embryos*, Am. J. of Pathol., 1937, t. 13, p. 149.
11. Grossfeld I., *Handbuch der Eierkunde*, Berlin, Springer, 1938.
12. Knothe H., *Das Verhalten von aeroben Bakterien in gebrüteten Hühnereiern*; I, Zbl. f. Bakteriol., 1952, t. 138, nr. 6, p. 383; II, Zbl. f. Bakteriol., 1952, t. 158, nr. 7–8, p. 454.
13. Lee F. H., *Use of the Chick Embryo for Preliminary in vivo Evaluation of Tuberculostatic Substances*, Ann. of New York Acad. of Sci., 1949, t. 52, nr. 5, p. 692.
14. Lee F. H. a. Stavitzky A. B., *Intravenous Infection of the Chick Embryo with Tubercle Bacilli (Inhibitory Effect of Streptomycin)*, Am. Rev. of Tub., 1947, t. 55, nr. 3, p. 262.
15. Levaditi, *Les ultravirus des maladies humaines*, Paris, Maloine, 1938, p. 252.
16. Levi-Montalcini R. a. Hamburger V., *Selective Growth Stimulating Effects of Mouse Sarcome on the Sensory and Sympathetic Nervous System of the Chick Embryo*, J. Exp. Zool., 1951, t. 116, nr. 2, p. 321.
17. Menkes B., *Aplicarea metodei mentorului în dezvoltarea embrionară la animale. I. Transplantări de tegument embrionar aparținînd la rase diferite de găini*, Anal. Acad. R.P.R., 1950, t. II, mem. 36, p. 1400.
18. Menkes B. și Brătianu-Rîmniceanu C., *Cercetări experimentale asupra rahiomieloschisisului*, Bul. științ. Acad. R.P.R., Seria: științe medicale, 1950, t. II, nr. 9, p. 1093.
19. Menkes B., Cotăescu E., Deleanu M. și Oțetea Gh., *Cercetări asupra formării și dezvoltării țesuturilor hibride la embrioni în diferite condiții experimentale*, Bul. științ. Acad. R.P.R., Secția de științe medicale, 1956, t. VIII, nr. 1, p. 307.
20. — *Cercetări asupra creșterii unor tumori maligne transplantate pe corpul sau pe membrana corion-alantoidiană a embrionului de găină și asupra reacției epiteliilor și mezenchimului embrionar în prezența acestor transplante*, Bul. științ. Acad. R.P.R., Secția de științe medicale, 1956, t. VIII, nr. 1, p. 307.
21. Menkes B. și Sandor St., *Cercetări asupra reactivității complexului embrionar la infecția tuberculoasă*, Studii și cercetări științifice Acad. R.P.R., Baza Timișoara, 1956, t. III, nr. 3–4, p. 20.
22. Moore M., *The Chorio-allantoic Membrane of Chick Embryos and its Response to Inoculation with some Mycobacteria*, J. Am. Pathol., 1942, t. 18, p. 827.
23. Nicolau St., *Proliferația kletok v celoveceskom i jivotnom organizme pod vliianiem nekotorîh virusov*, Usp. sovrem. biol., 1955, t. XXXIX, nr. 1, p. 25.
24. Pandit C. G., Sanjiva Reo a. Shortt H. E., *Response of the Chorio-allantoic Membrane of the Developing Chick Embryo to Inoculation with Various Substances, with Special Reference to B. Proteus* X_{19}, Ind. J. Med. Res., 1938, t. 25, p. 595.
25. Rist N., *Pathologie et thérapeutique expérimentales de la tuberculose*, Bibl. Tuberculosea, Schw. Schift. F. Tub., 1948, supl., p. 55.

26. Schürmann R., *Zur Histogenes des Tuberkels in der Corioallantois Membran des Hühnchens*, Virch. Arch., 1952, t. 321, p. 325.
27. Tebiakina A. E., *Kurinii embrion kak model dlia oțenki lecebnogo deistviia antibiotikov pri eksperimentalnoi holere*, J. mikrobiol., epidemiol. i immunol., 1955, nr. 7, p. 25.
28. Tokin B. P., *Immunitet zarodișei*, Izd. Leningr. Univ., 1955.
29. Tsun Tung, *Experimental Production and Chemoprophylaxis of Corynebacterium Diphteriae Infection in the Chick Embryo*, Am. J. of Hyg., 1945, t. 41, p. 57.
30. Weil A. J. a. Gall L. S., *Chemotherapeutic and Immunotherapeutic Testing of Ebertkella Typhosa in the Developing Chick Embryos*, J. of Immunol., 1941, t. 41, p. 115.
31. Weil A. J. a. Volentine J. A., *Infection of the Developing Chick Embryo with Dysentery Bacilli*, Proc. Exp. Biol. Med., 1940, t. 44.
32. Zalkind S. I., *Mitoticeskii rejim organizma v norme i patologhii*, Usp. sovrem. biol., 1954, t. 38, nr. 1, p. 68.



Fig. 148. — Embrion de găină fixat în a treia zi de incubaţie, după injecţia spaţiului subembrionar cu tuş în a doua zi de incubaţie. Tuşul fagocitat la nivelul cadrului vitelin. Preparat total.



Fig. 149. — Aceeași explicație ca la figura 148. Se remarcă lipsa fagocitozei în ținutul ariei transparente.



Fig. 150. — Secţiune prin embrionul de găină (a treia zi de incubaţie) şi aria sa vasculară adiacentă. Injecţia de tuş în spaţiul subembrionar. Fagocitoza tuşului de către endodermul vitelin.

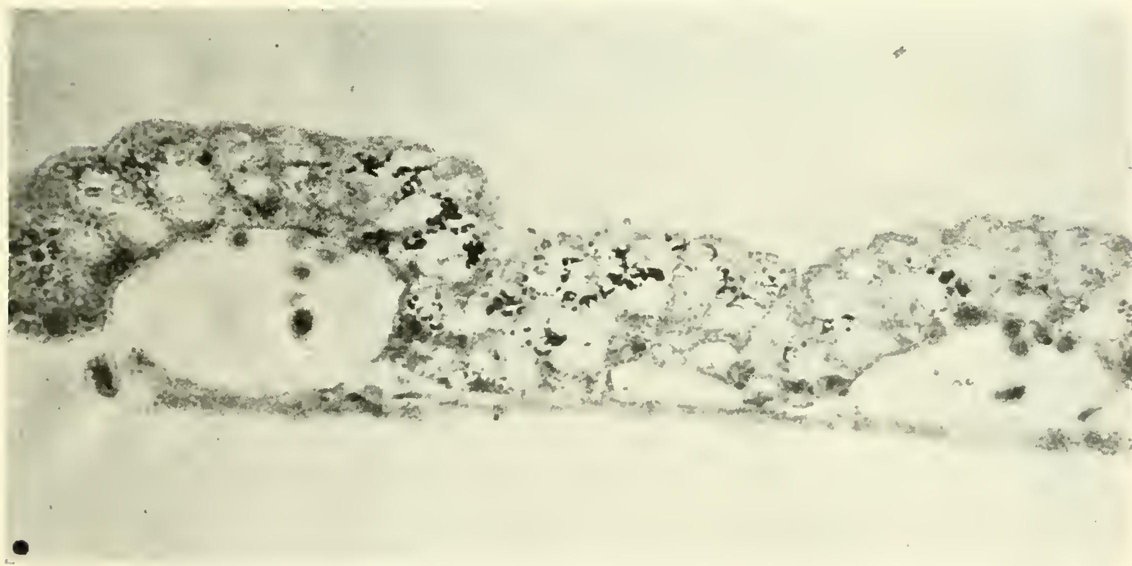
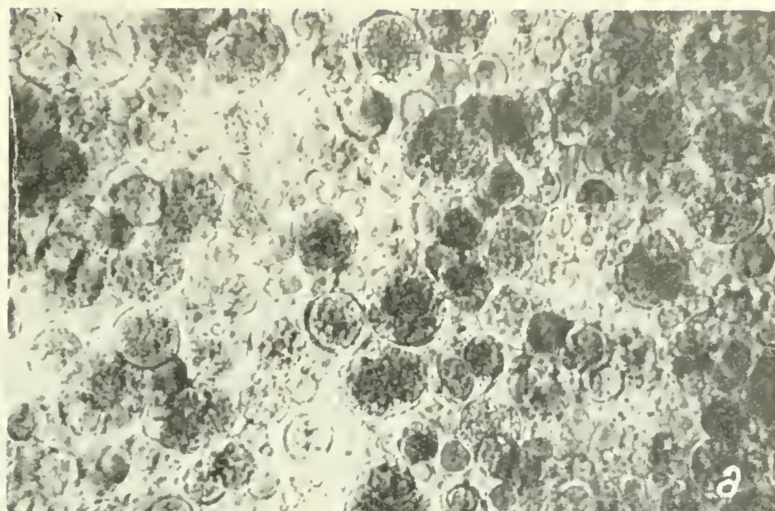
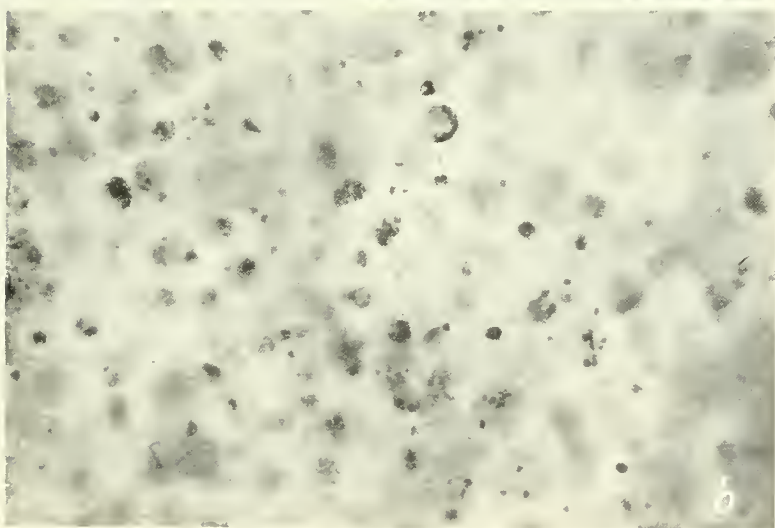


Fig. 151. — Amănunt din figura 150. Injecţia de tuş în spaţiul subembrionar. Fagocitoza tuşului de către endodermul vitelin. Absorbţia tuşului pe suprafaţa globulelor viteline.





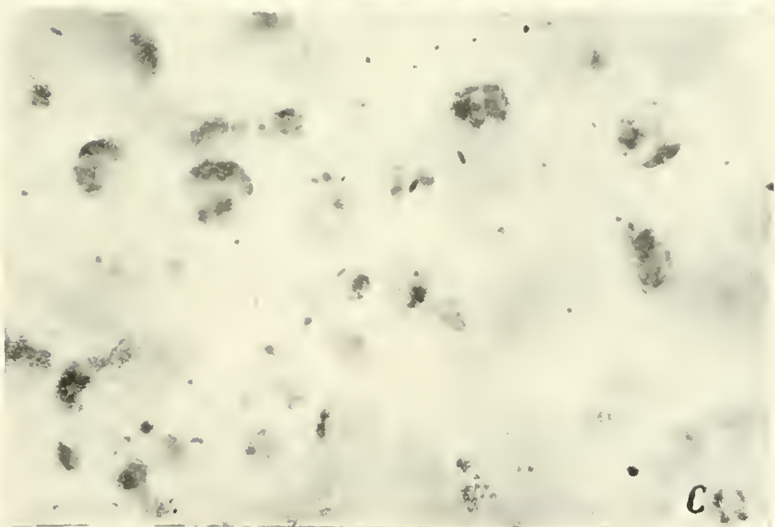


Fig. 152. — Injecția de tuș în spațiul subembrionar. *a* — Endodermul vitelin normal, la 3 zile de incubație; preparat total. Fixare: acid osmic. Conservare glicerină. *b* — Absorbția grăunțelor de tuș fagocitate de celulele endodermului vitelin, la suprafața globulelor viteline; Preparat total clarificat în glicerină. *c* — Detalii din *b*.

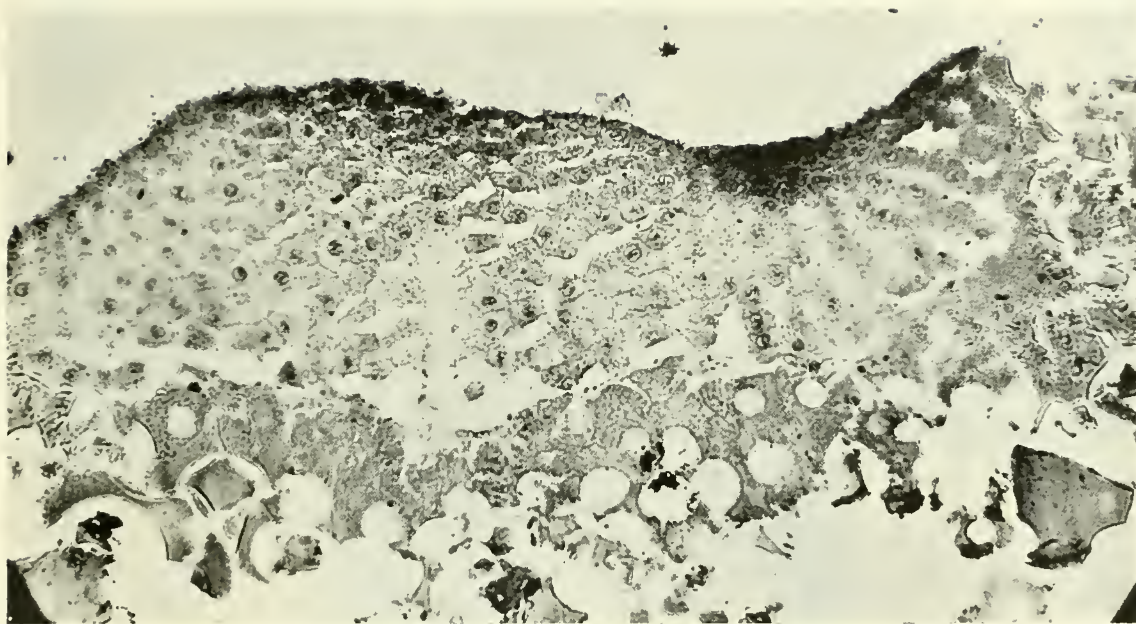


Fig. 153. — Placă embrionară de păstrăv (*Fario trutta*). Segmentare discoidală. Se văd raporturile discului segmentat cu vitelusul subiacent. Începutul formării cavității subgerminale.

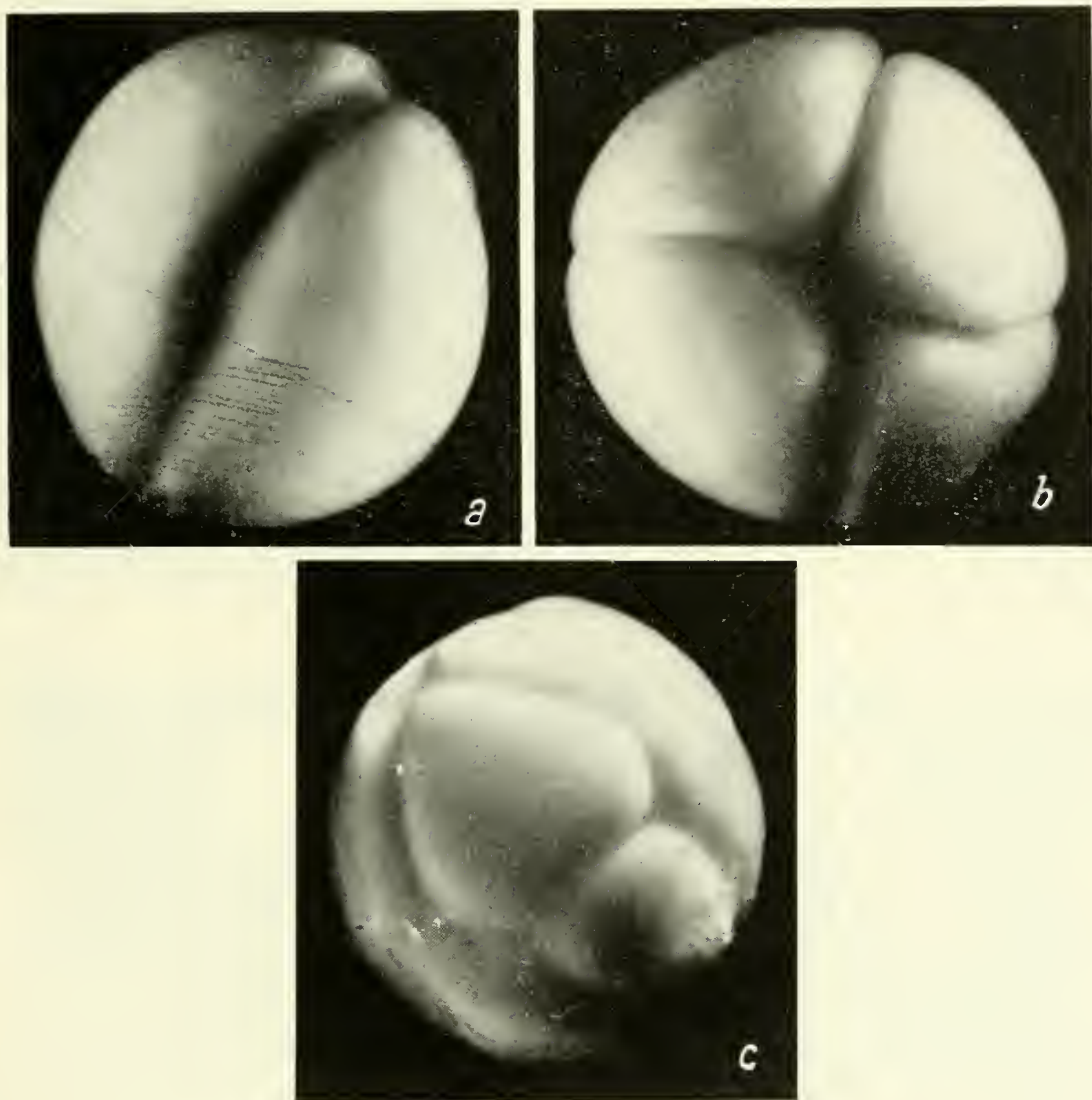
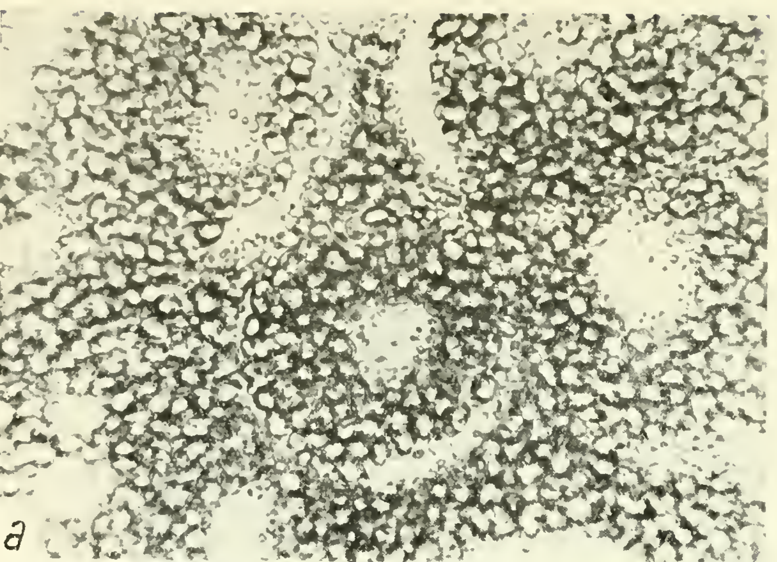


Fig. 154. — (*a*, *b* şi *c*) — Segmentarea oului de triton. Segmentare totală, inegală.



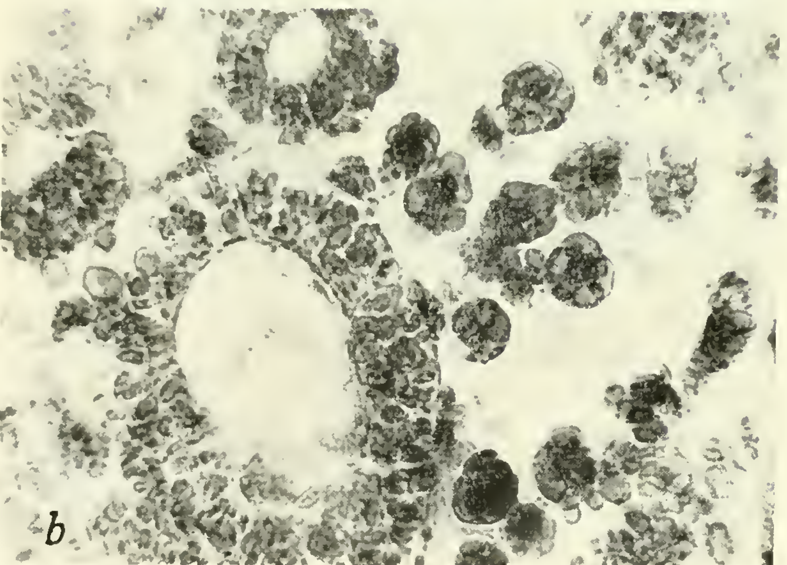


Fig. 155. — *a* — Blastomere de triton. Fiecare blastomer posedă „provizia" sa de plăcuțe viteline. Clarificarea centrală = nucleul. *b* — Secțiune prin mormoloc la începutul vieții larvare libere. Tub mezonefrotic și celule sanguine. Fiecare celulă prezintă și în acest stadiu provizia de vitelus.

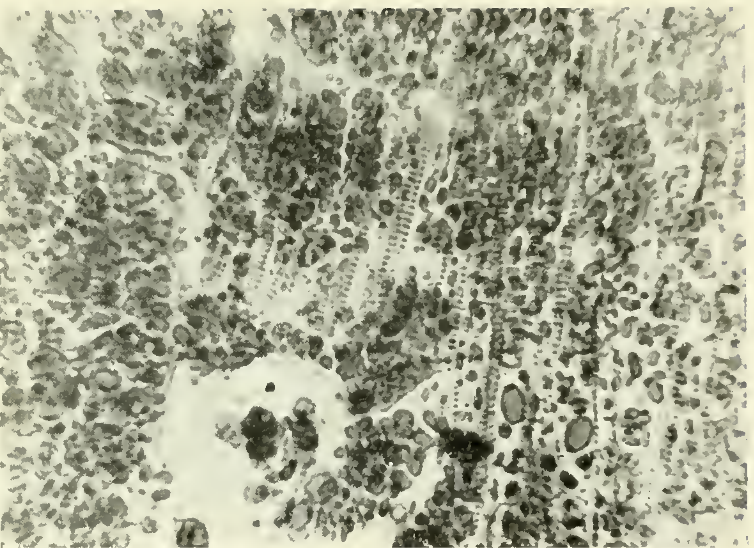


Fig. 156. — Mormoloc de triton. Musculatura striată cu provizia de vitelus.



Fig. 157. — Mormoloc de broască la începutul vieții larvare libere. Secțiunile *a*, *b* și *c* demonstrează începutul consumării depozitelor de vitelus la nivelul tubului neural și al musculaturii dorsale.

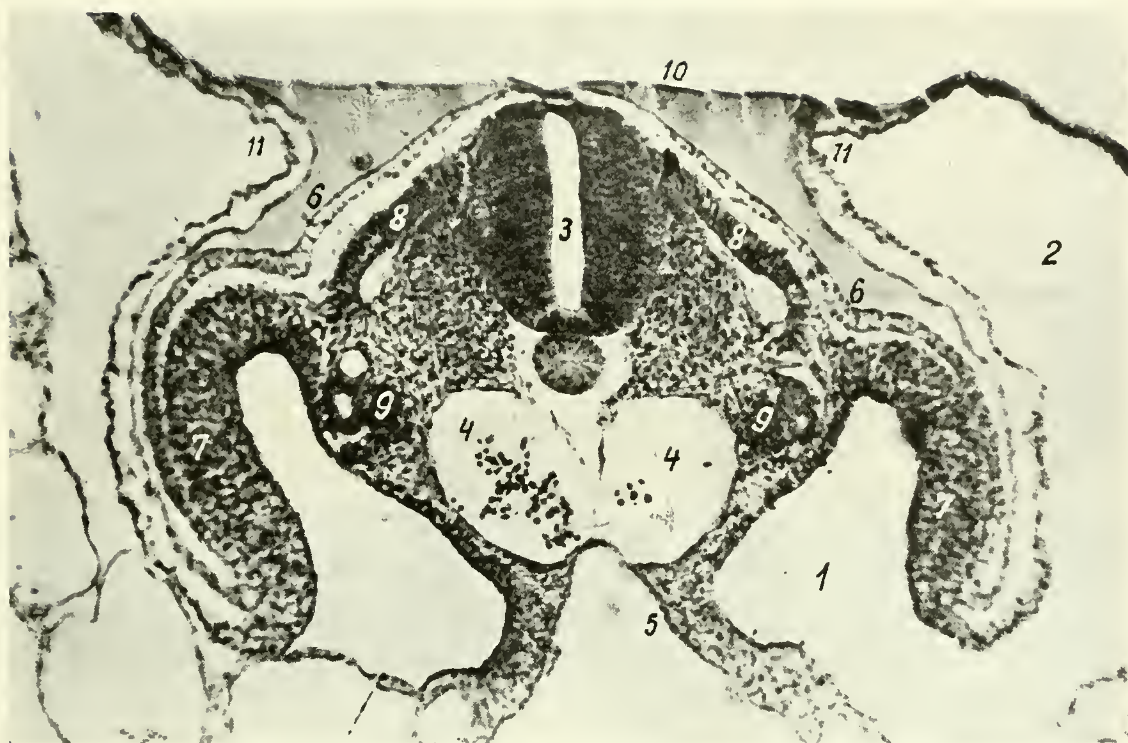


Fig. 158. — Secţiune transversală prin trunchiul embrionului de găină de 3 zile de incubaţie.

1 — Celomul intra- şi *2* — extraembrionar; *3* — Tubul neural (*chorda*); *4* — aorta; *5* — endoderm; *6* — ectoderm; *7* — mezoderm, cu somato- şi visceropleură; *8* — somite; *9* — corpul Wolff; *10* — membrana vitelină; vase viteline; *11* — cutele amniotice laterale.



Fig. 160. — Injecţie interstiţială de tuş diluat la embrionul de găină de 4 zile de incubaţie. Macrofage care au fagocitat granulele de tuş. Tuşul se găseşte printre picăturile lipidice, sub formă de conglomerate, de obicei rotunde.

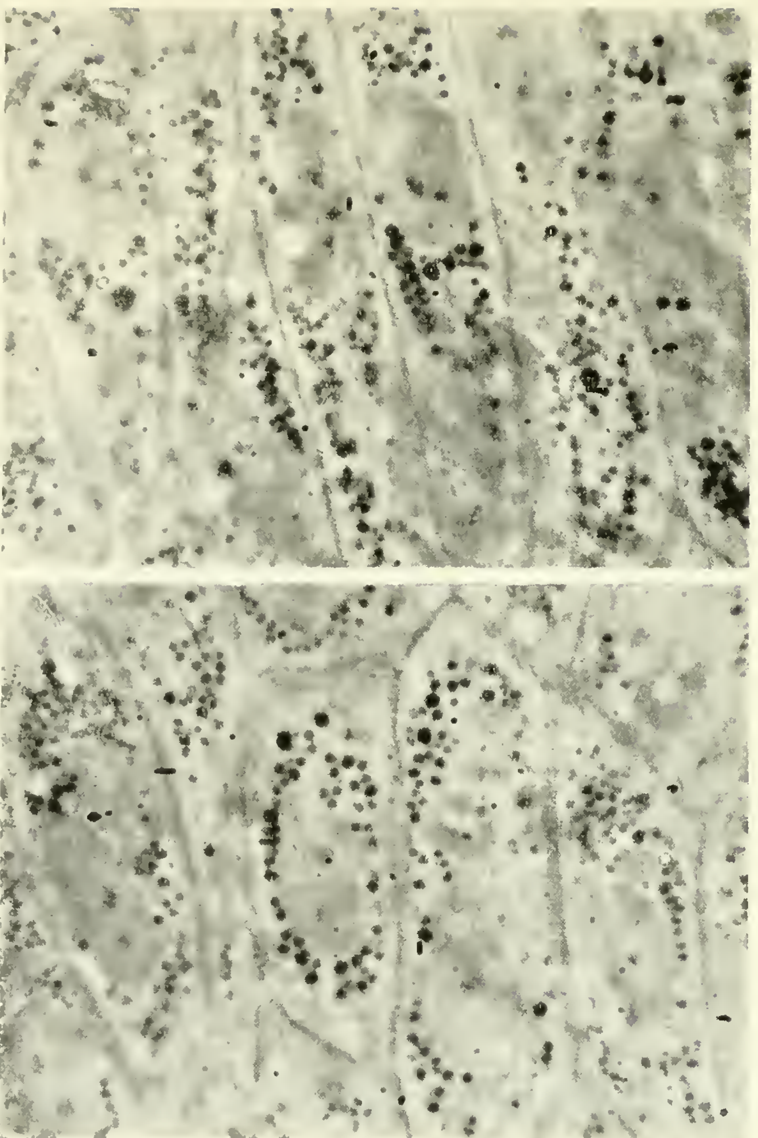


Fig. 159. — Ectodermul seroasei lui Baer. Acid osmic, glicerină, contrast de fază, imersie. Granulele lipidice formează „coroane" tipice, perinucleare.

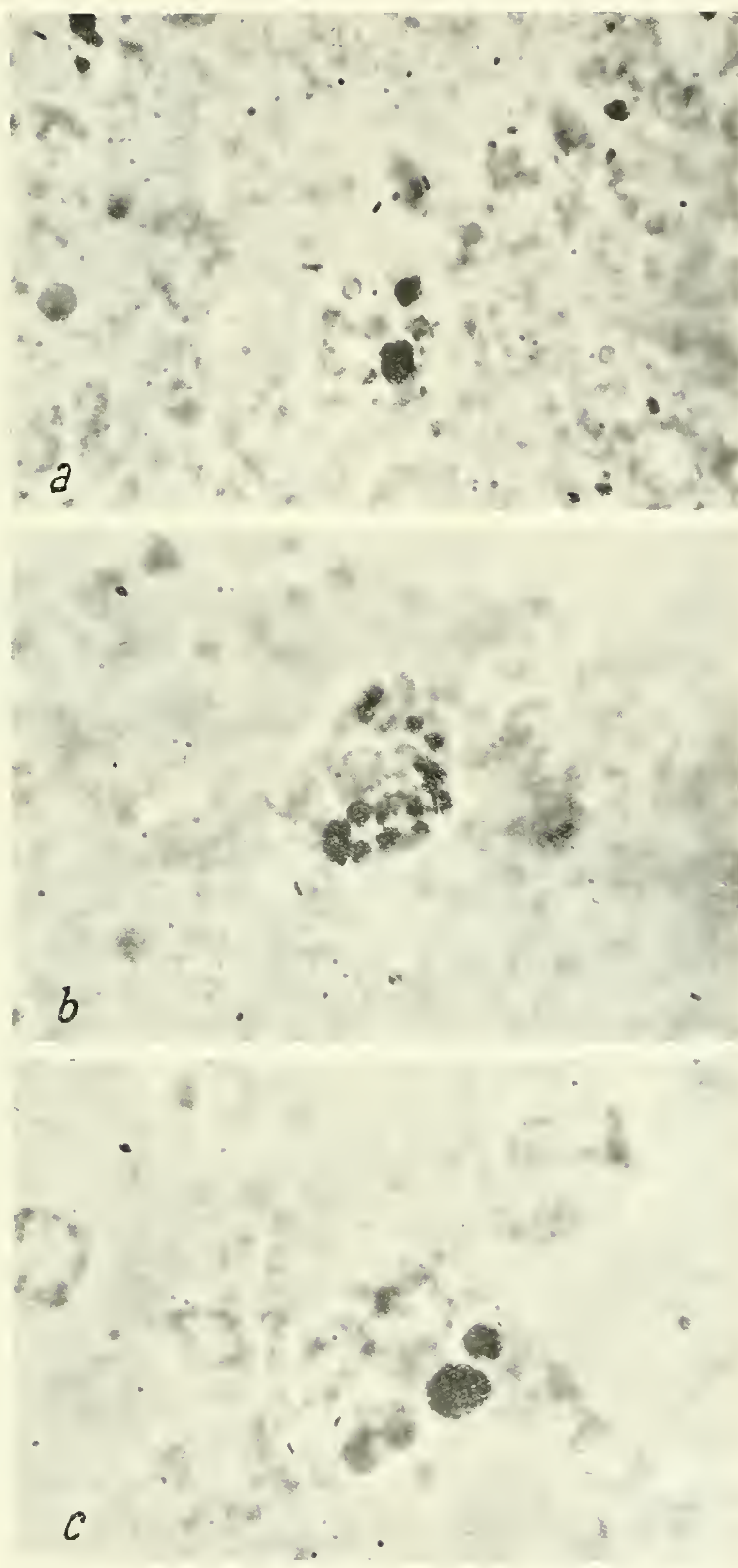
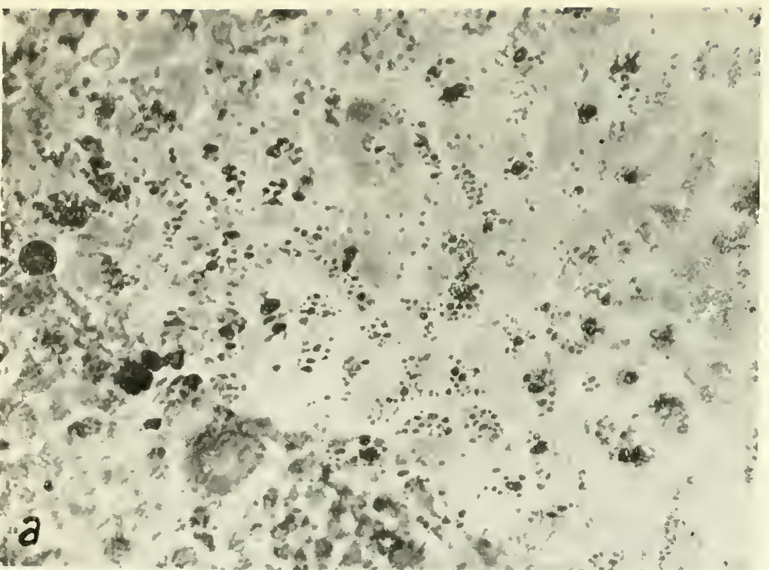
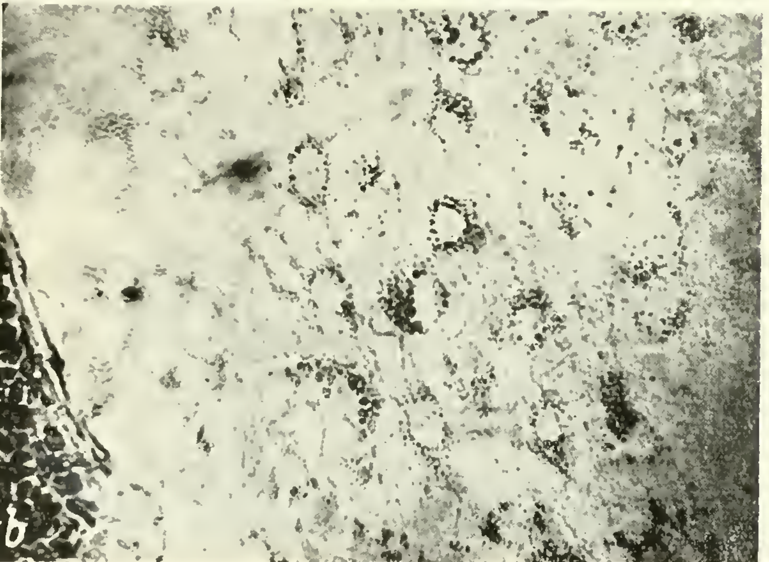


Fig. 161. — *a*, *b* şi *c* — Membrana corion-alantoidiană (10 zile de incubaţie). Fagocitoza tuşului de către macrofage. Glicerină, imersie, contrast de fază. Aglomerări rotunde de grăunţe de tuş, care par a se afla în interiorul unor vacuole de digestie.





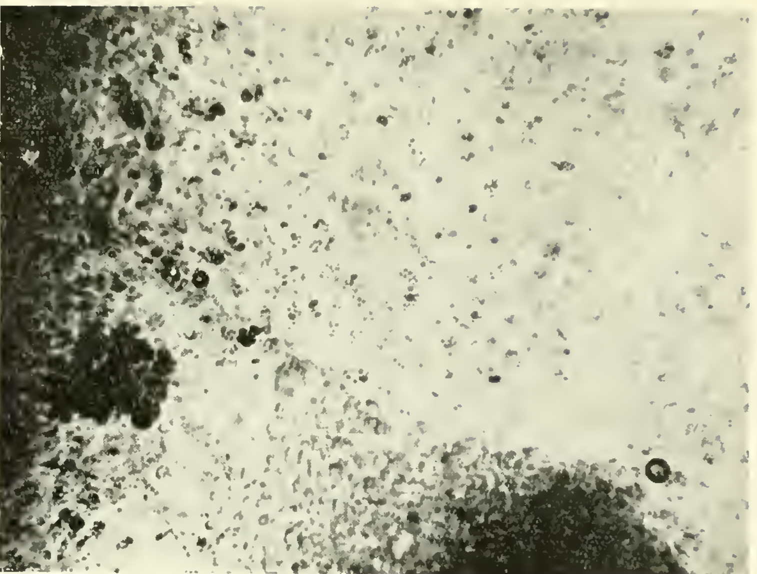


Fig. 163. — Marginea cadrului vitelin și aria pelucidă adiacentă la 4 zile de incubație. Acid osmic, glicerină. Preparat total. Celulele endodermului vitelin, încărcate cu globule viteline (stînga și jos). Celulele din zona pelucidă posedă „coroanele" lipidice perinucleare.

Fig. 162. — *a* și *b* — Endodermul din ținutul ariei pelucide. Embrionul de găină de 4 zile de incubație. Acid osmic, glicerină. Coroanele perinucleare de picături lipidice.

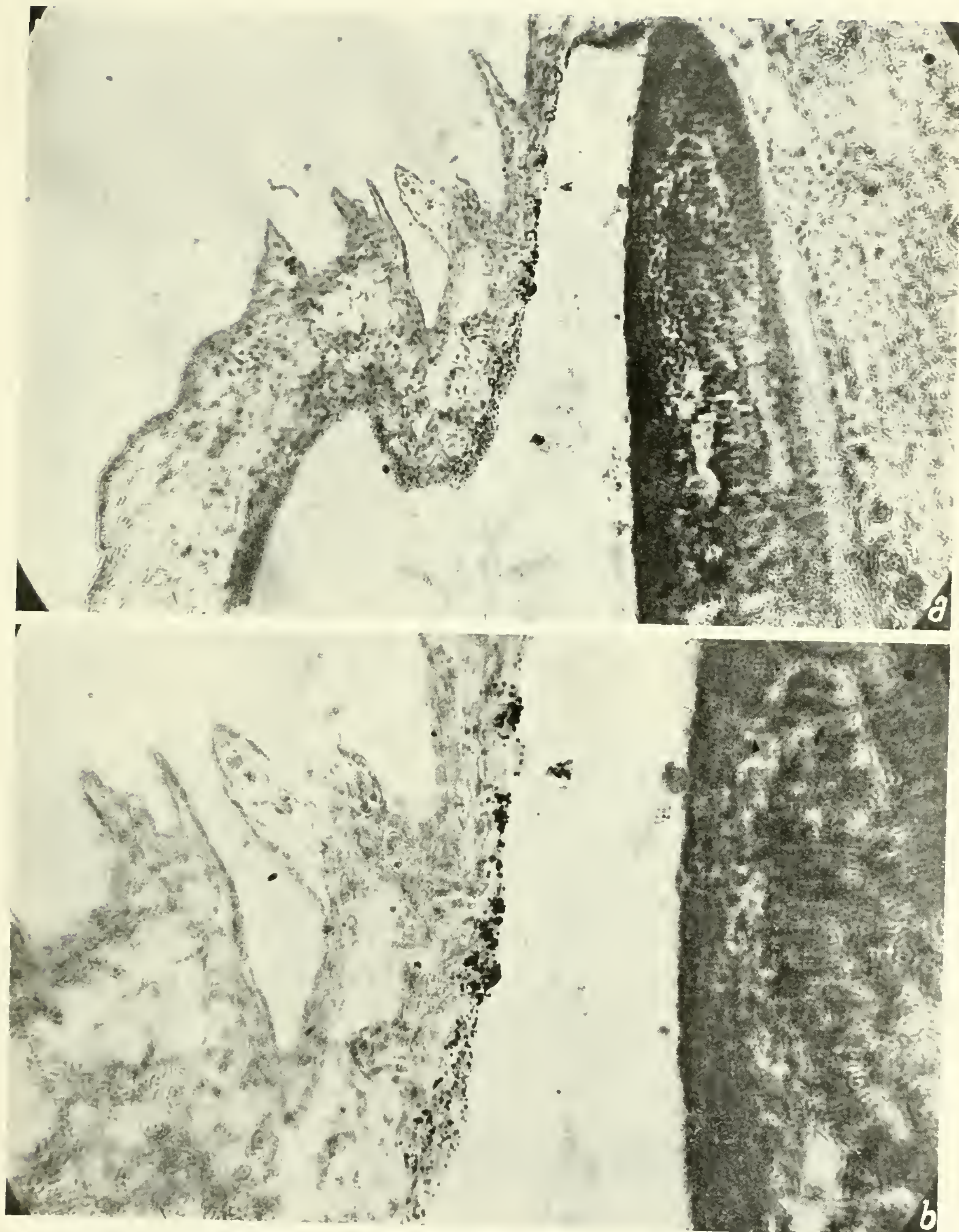


Fig. 161. — *a* — Injecţie de tuş în canalul ependimar al embrionului de găină de 4 zile de incubaţie. După trei zile, numai tavanul subţire al rombencefalului a fagocitat intens tuşul. *b* — Amănunt din *a*.

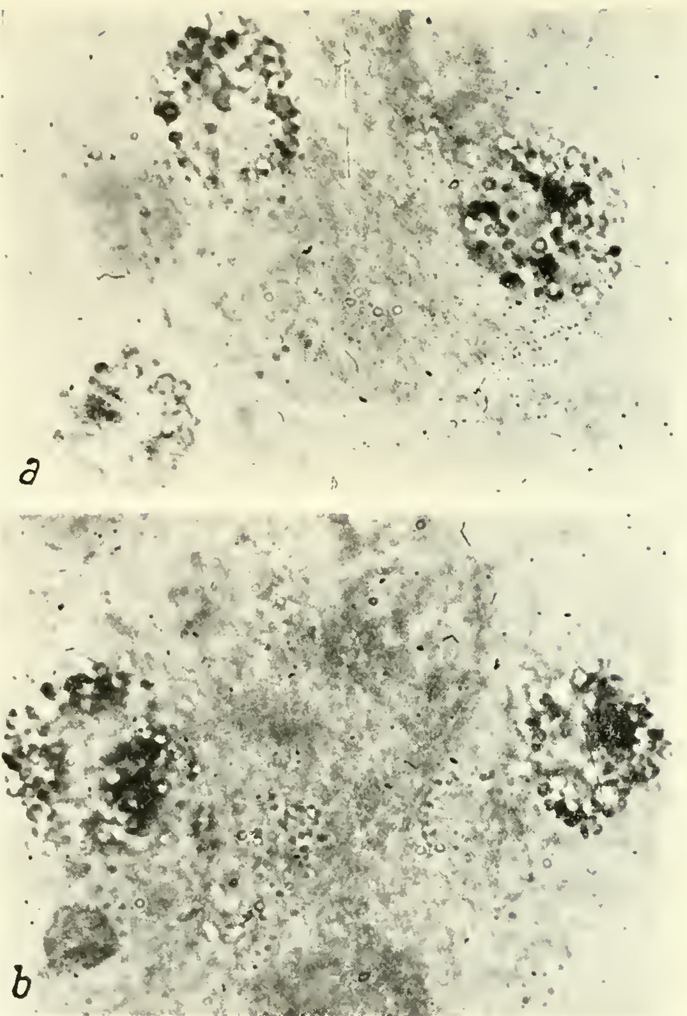


Fig. 165. — *a* și *b*. — Macrofagele embrionului de găină de 10 zile de incubație. Colorația vitală transalantoidiană cu albastru de tripan. Printre picăturile lipidice se observă granule de albastru de tripan. (închise).

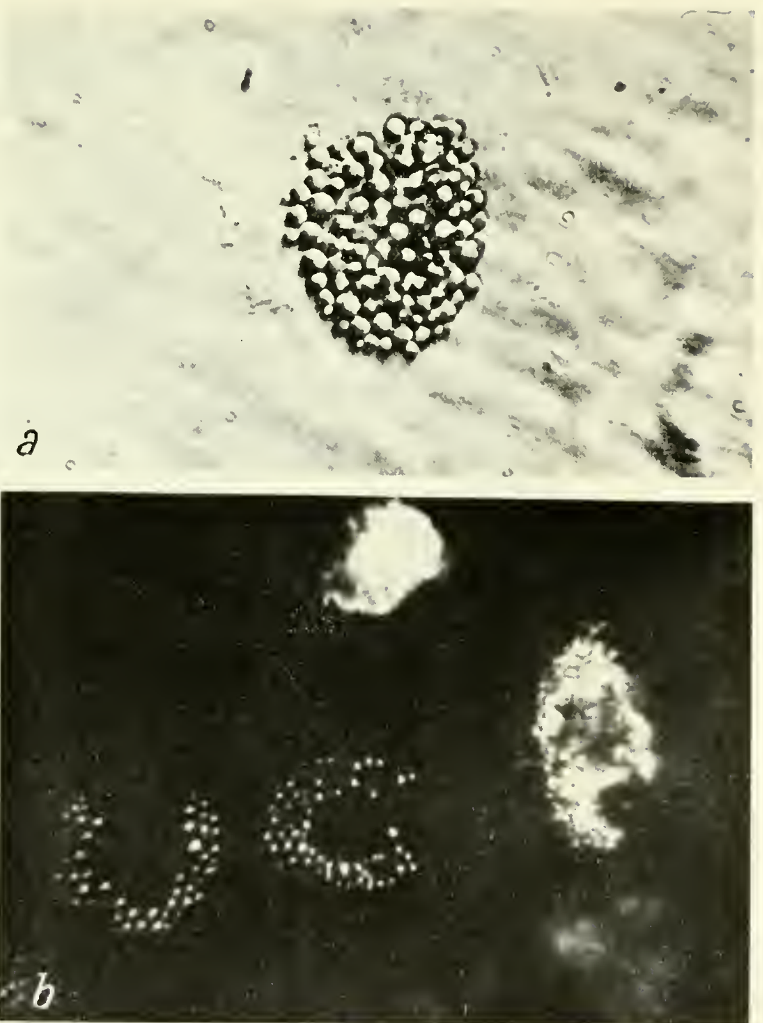


Fig. 166. — Macrofagele embrionului de găină. *a* — Picăturile lipidice. *b* — Imaginea în cîmpul obscur.

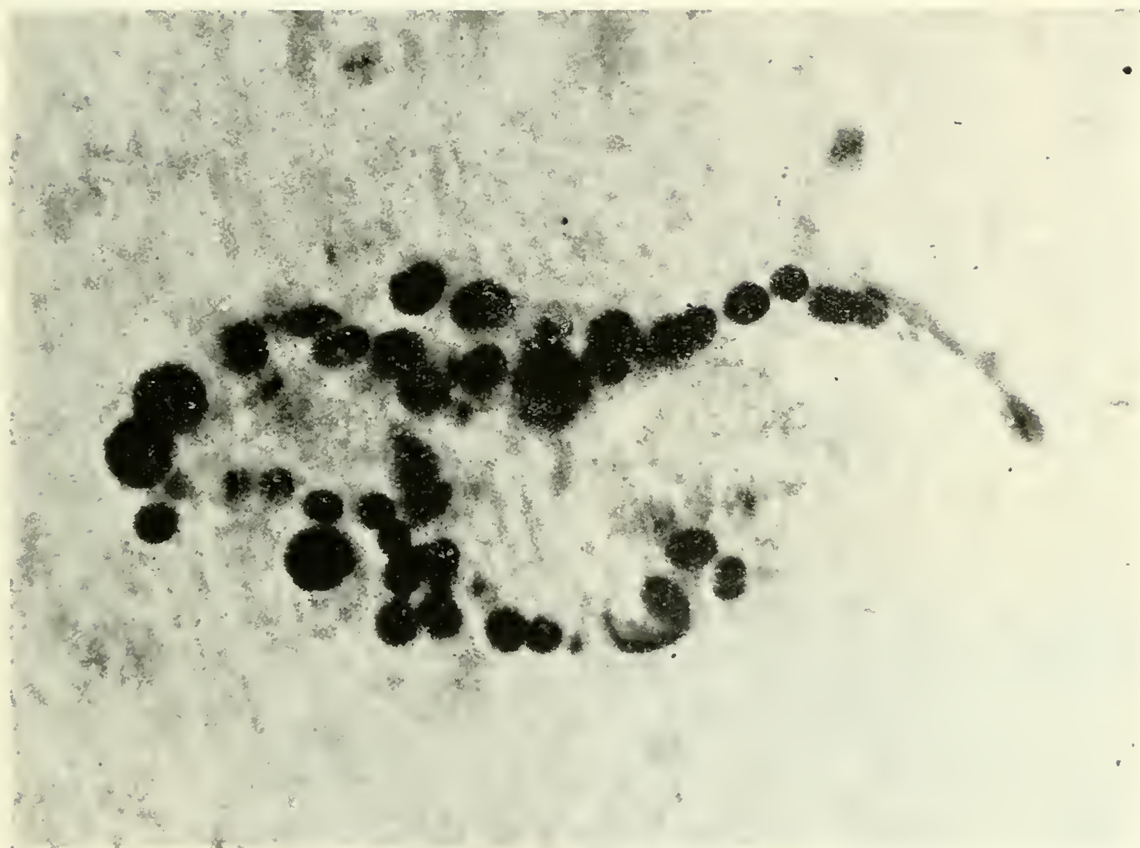
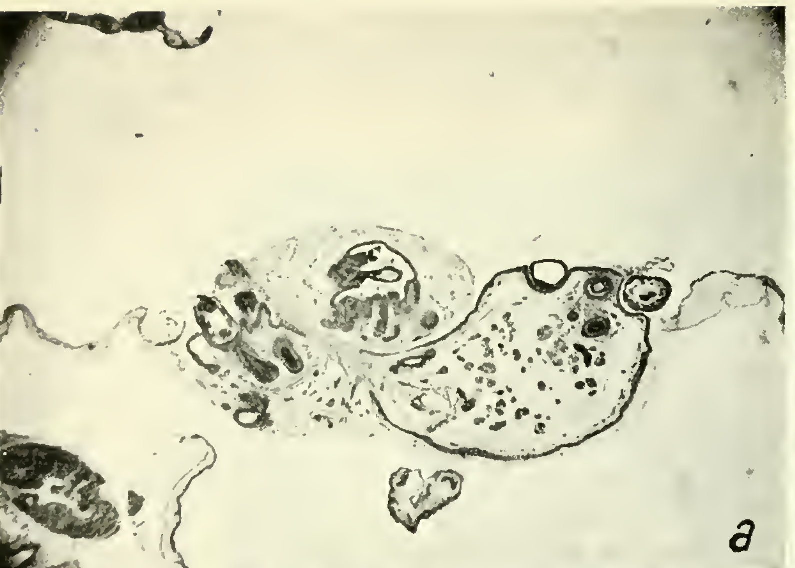
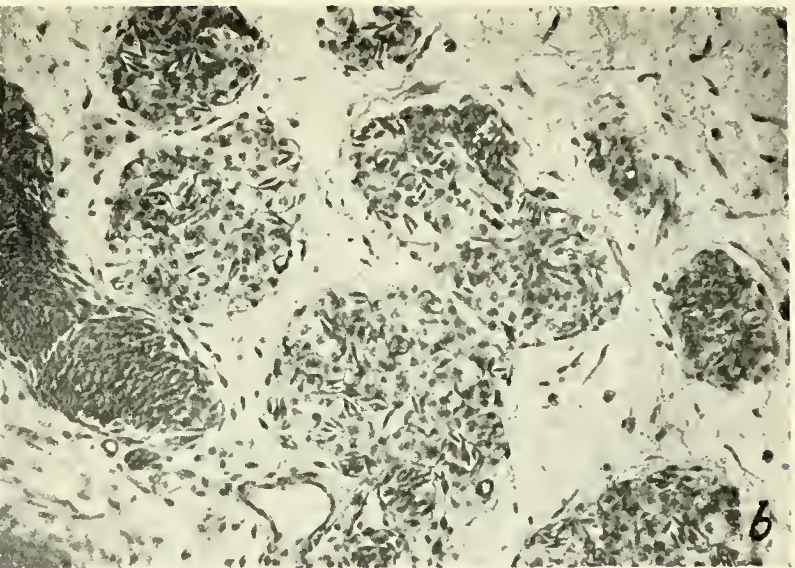


Fig. 167. — Macrofag al embrionului de găină. Colorația vitală cu albastru de Nil. S-au colorat picăturile lipidice.





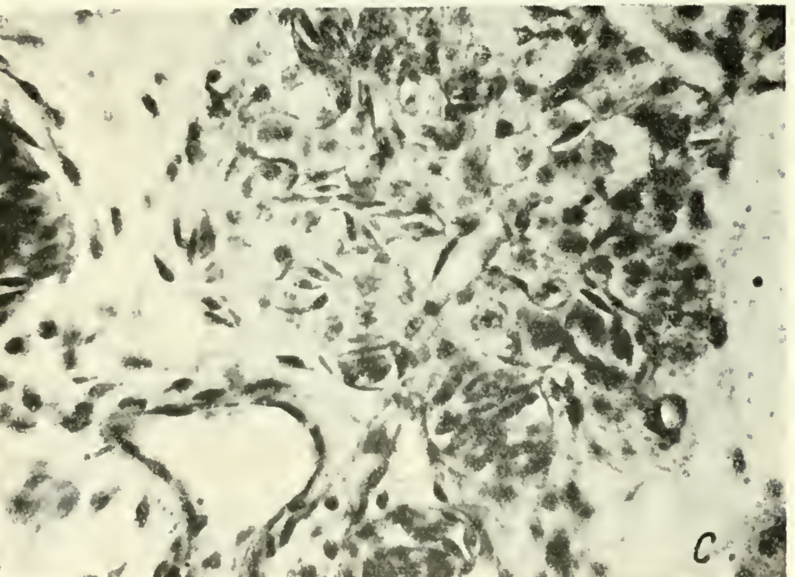


Fig. 168. — *a* — Tegument embrionar de porumbel, transplantat pe membrana corion-alantoidiană a embrionului de găină. S-au diferențiat lobulii grași. *b* și *c* — Detaliile acestor lobuli grași.

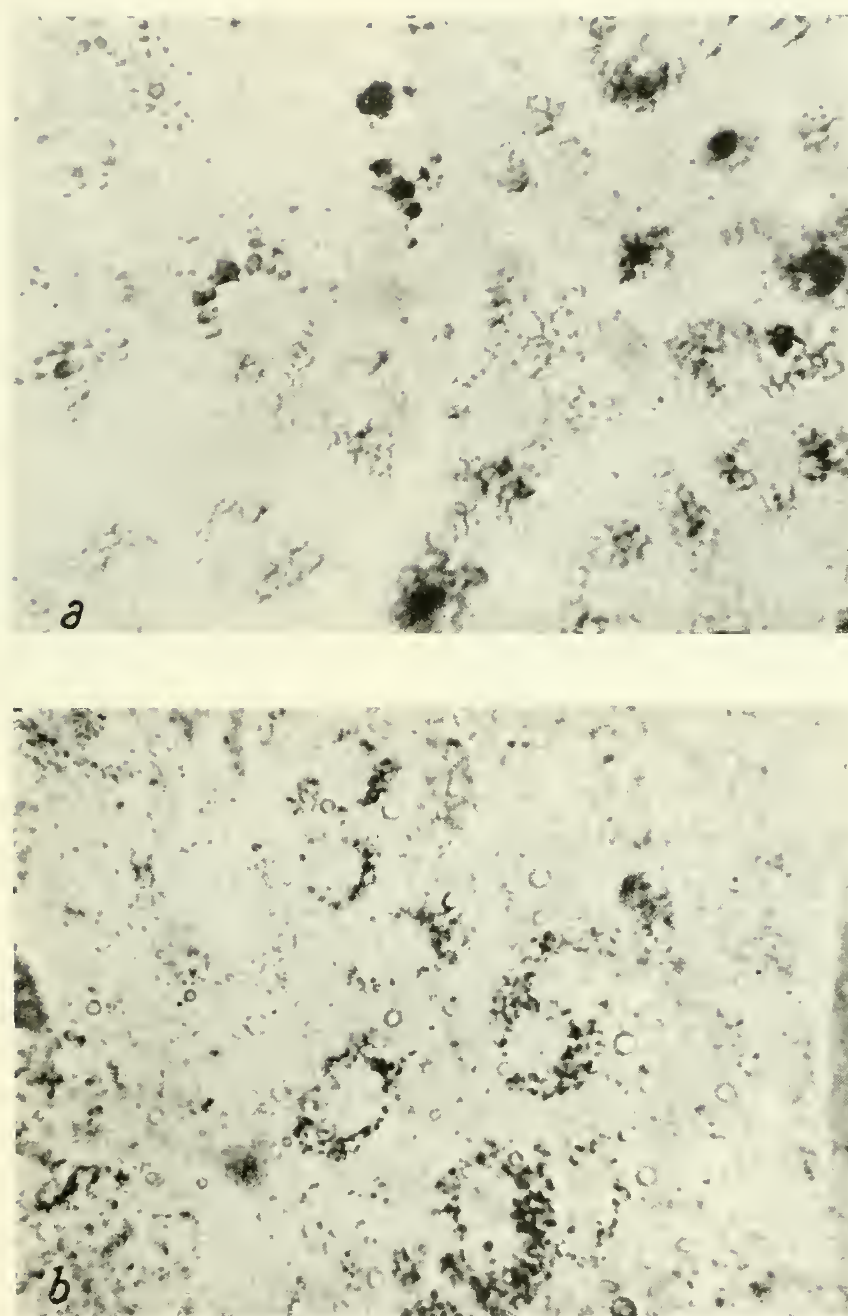


Fig. 169. — *a* și *b* — Epiteliul amniotic al embrionului de găină. Grăunțele de tuș fagocitate au o așezare asemănătoare cu aceea a coroanelor tipice de picături lipidice.

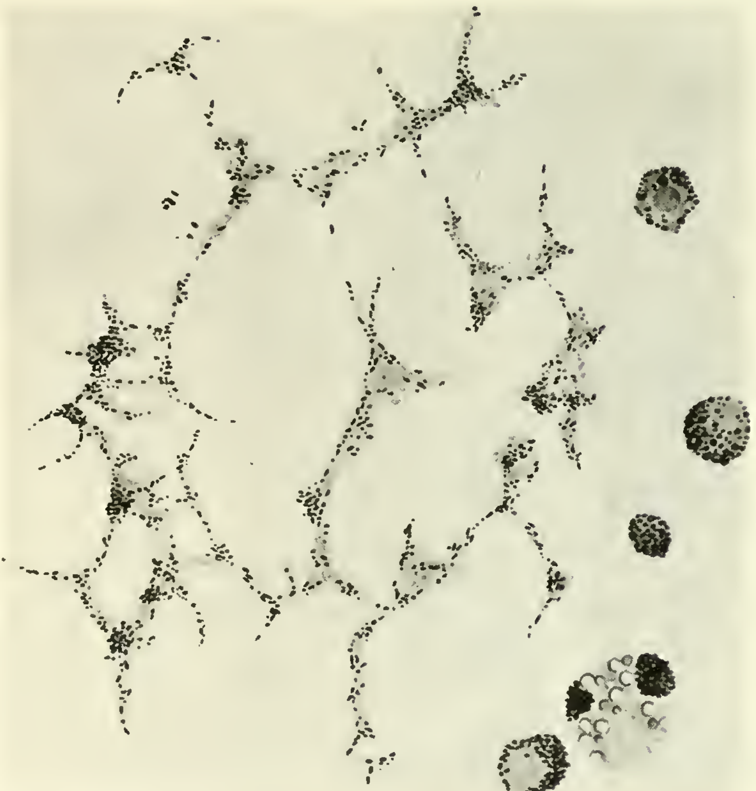


Fig. 171. — Melanoblaști normali, tegumentari, ai embrionului Plymouth, la 9 zile de incubație. Alături, macrofage care fagocitează fragmente detașate ale ramificațiilor melanoblaștilor. Melanoblaști rotunjiți.



Fig. 170. — Melanoblast de origine Plymouth, 12 zile după transplantarea tegumentului Plymouth pe embrionul de găină Leghorn. Alături două macrofage Leghorn care au fagocitat pigmentul heterorasial.



Fig. 172. — Fagocitoza propriului pigment în tegumentul embrionului Plymouth de 7 zile de incubație.

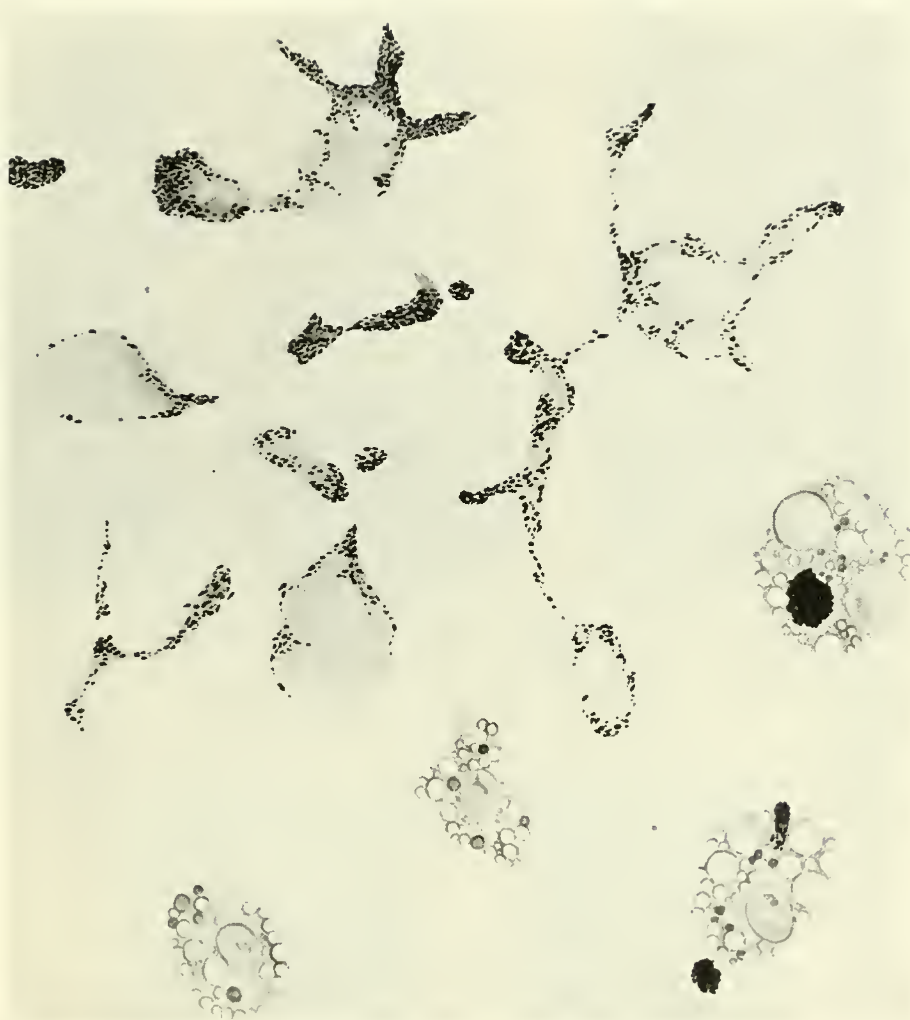


Fig. 173. — Fagocitoza propriului pigment în tegumentul embrionului de găină Plymouth la 13 zile de incubaţie.

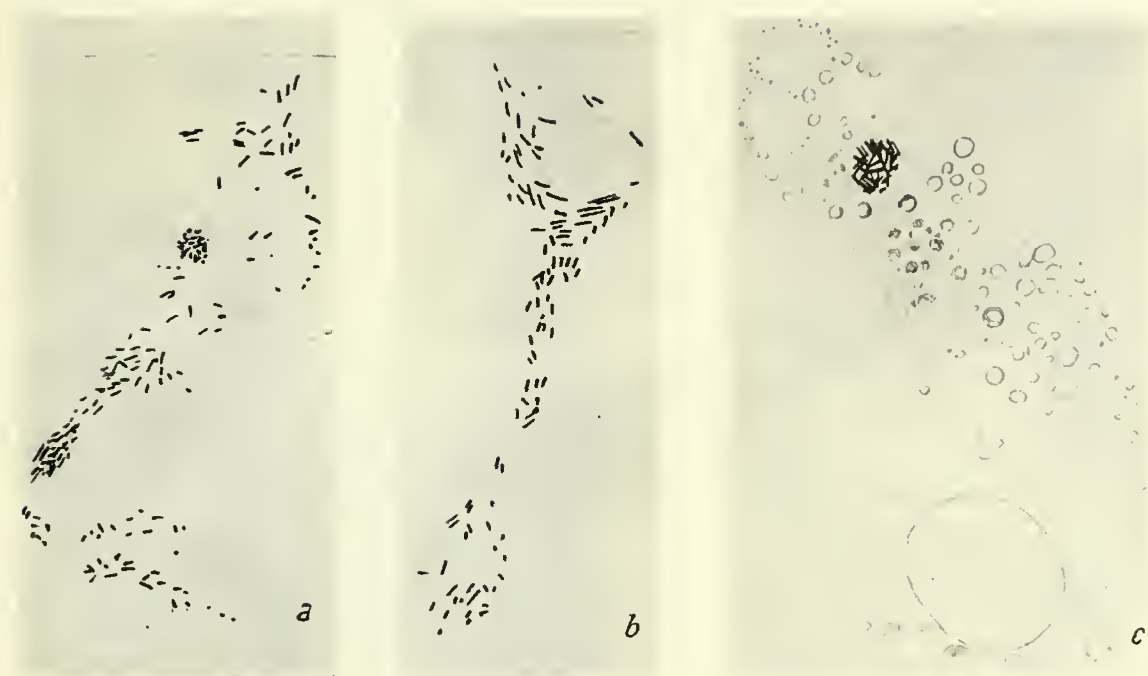


Fig. 174. — *a* și *b* — Melanoblaștii embrionului Plymouth de 13 zile de incubație; *c* — Macrofagele în același tegument, cu pigment fagocitat.

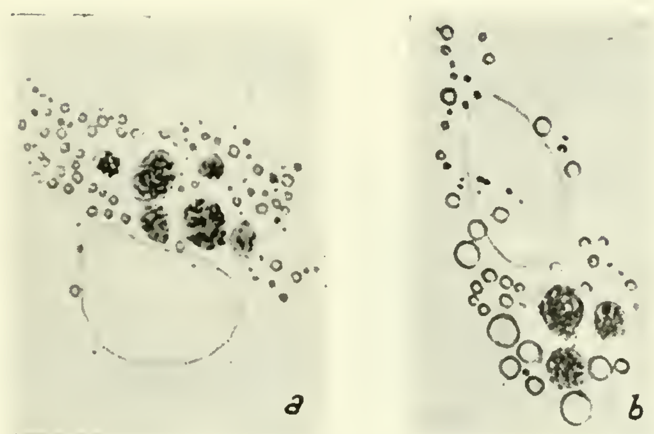
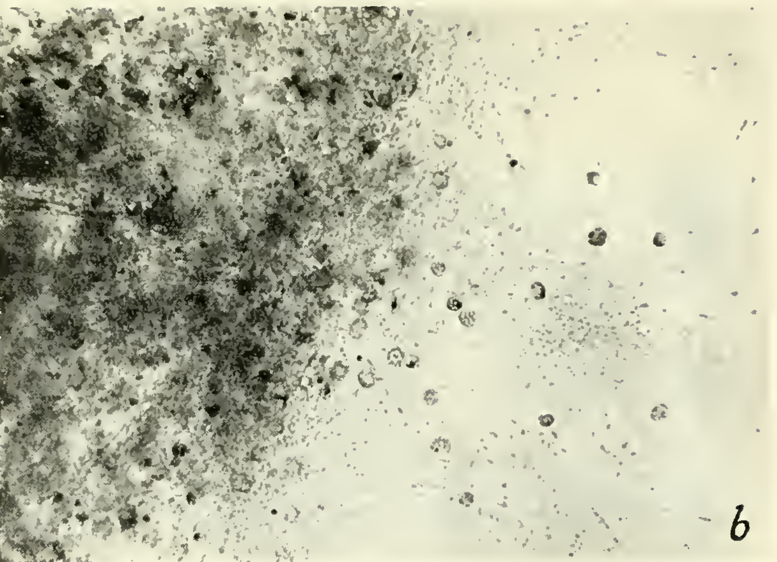


Fig. 175. — *a* și *b* — Macrofage în tegumentul embrionar al embrionului găinii Plymouth din apropierea melanoblaștilor. Pigment melanic fagocitat în vacuole de digestie (a șaptea zi de incubație).





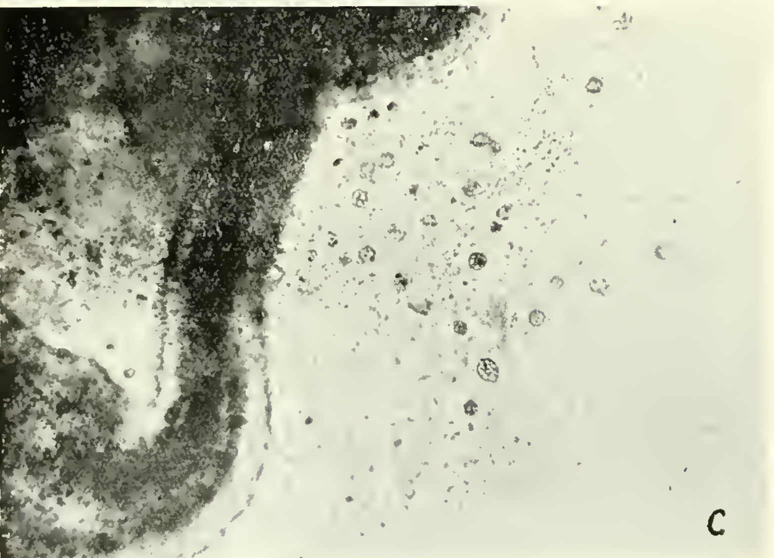


Fig. 176. — *a* — Tegumentul embrionar al rasei Plymouth (10 zile de incubaţie) în cultura de ţesut. Mediu : plasmă heparinată + extract embrionar homeorasial ; 48 de ore după începutul cultivării. Zona de creştere mezenchimatoasă. Emigrare de macrofage în parte încărcate cu pigment melanic fagocitat. *b* şi *c* — Amănunte din *a*.

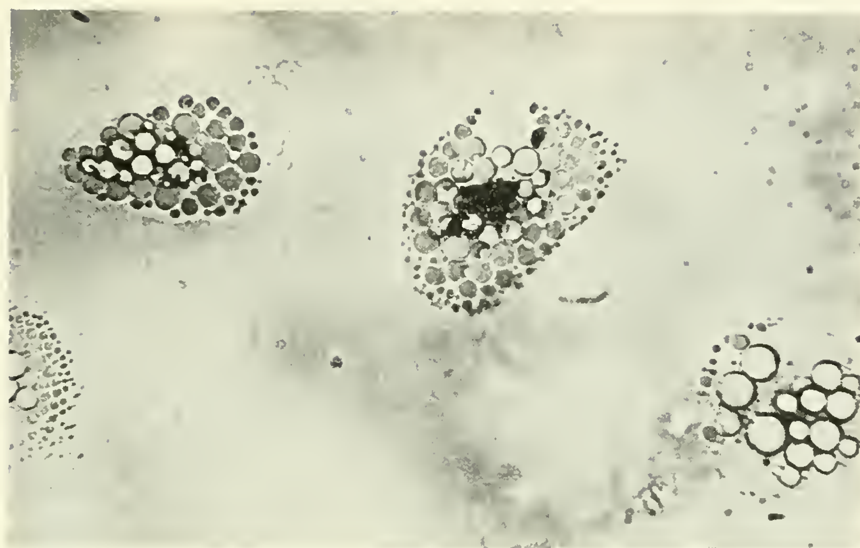


Fig. 177. — Cultura de țesut a tegumentului embrionar Plymouth. Macrofage emigrate, prezentînd pigment melanic fagocitat printre picăturile lipidice. Membrane ondulante.

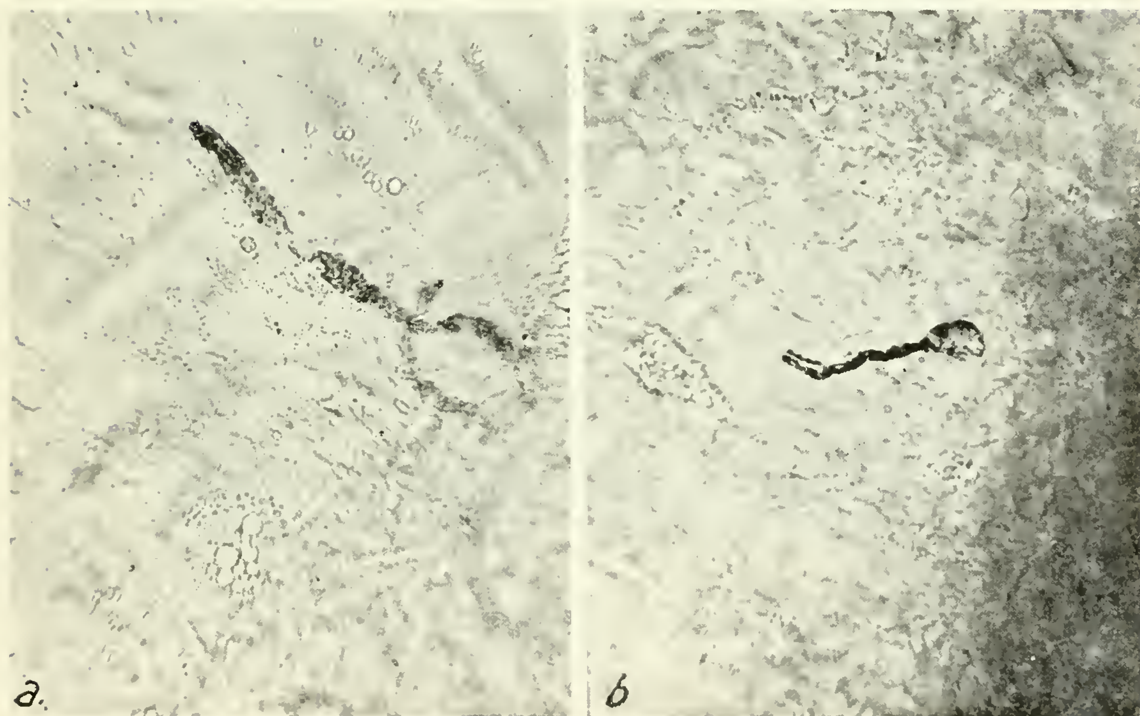


Fig. 178. — *a* și *b* — Cultura de țesut a tegumentului embrionar Plymouth. Emigrare de melanoblaști în zona de creștere.

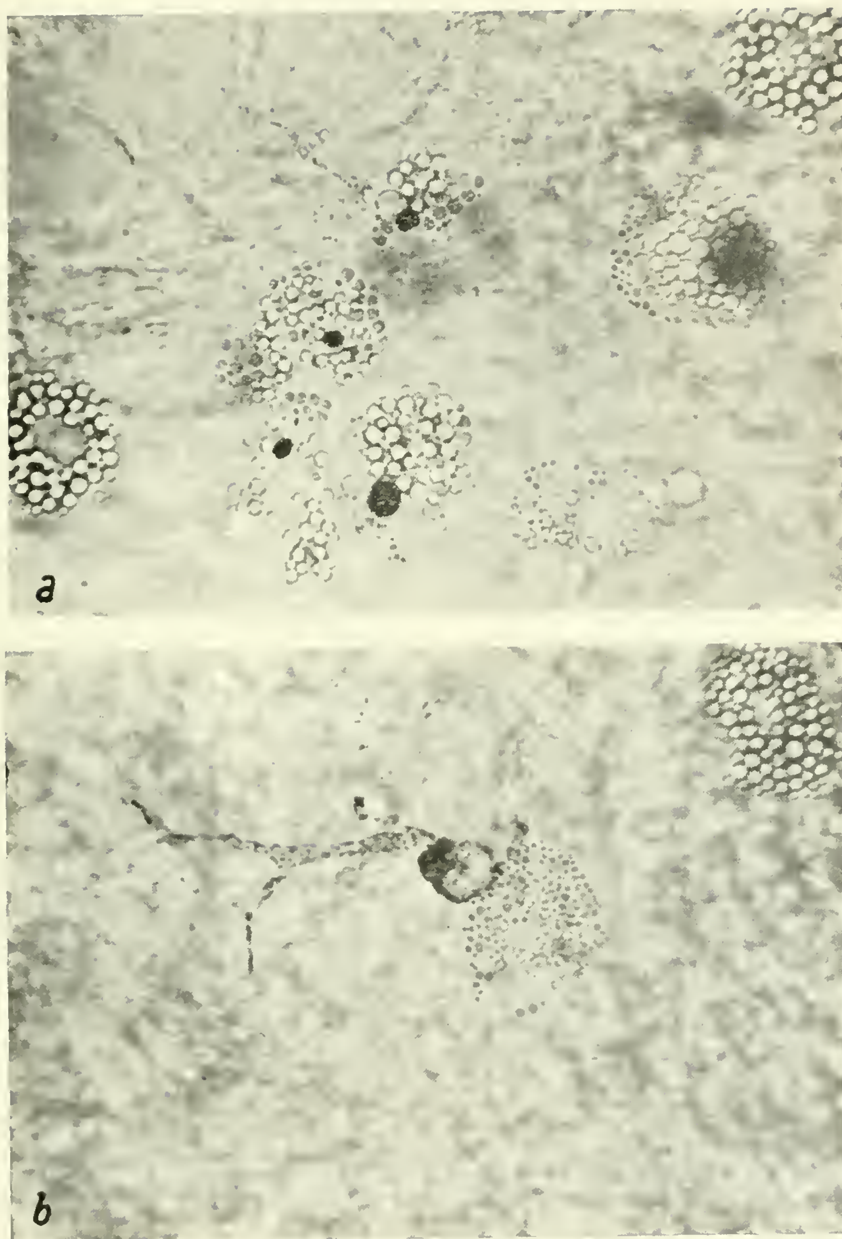


Fig. 179. — *a* — Cultura de tegument embrionar Plymouth. Macrofage cu pigment melanic fagocitat. *b.* — „întîlnire" între melanoblast și macrofag.

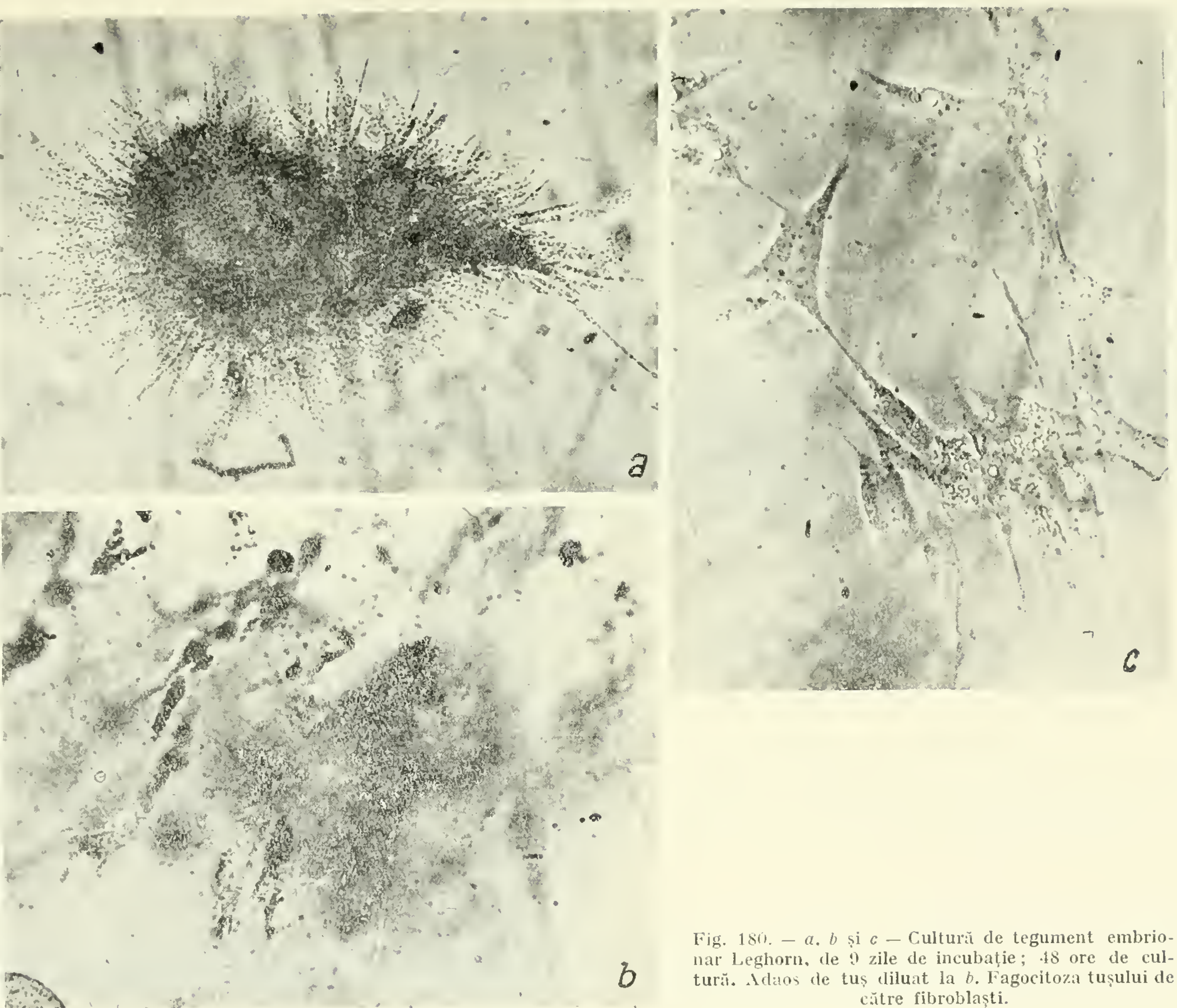


Fig. 180. — *a*, *b* și *c* — Cultură de tegument embrionar Leghorn, de 9 zile de incubație; 48 ore de cultură. Adaos de tuș diluat la *b*. Fagocitoza tușului de către fibroblaști.

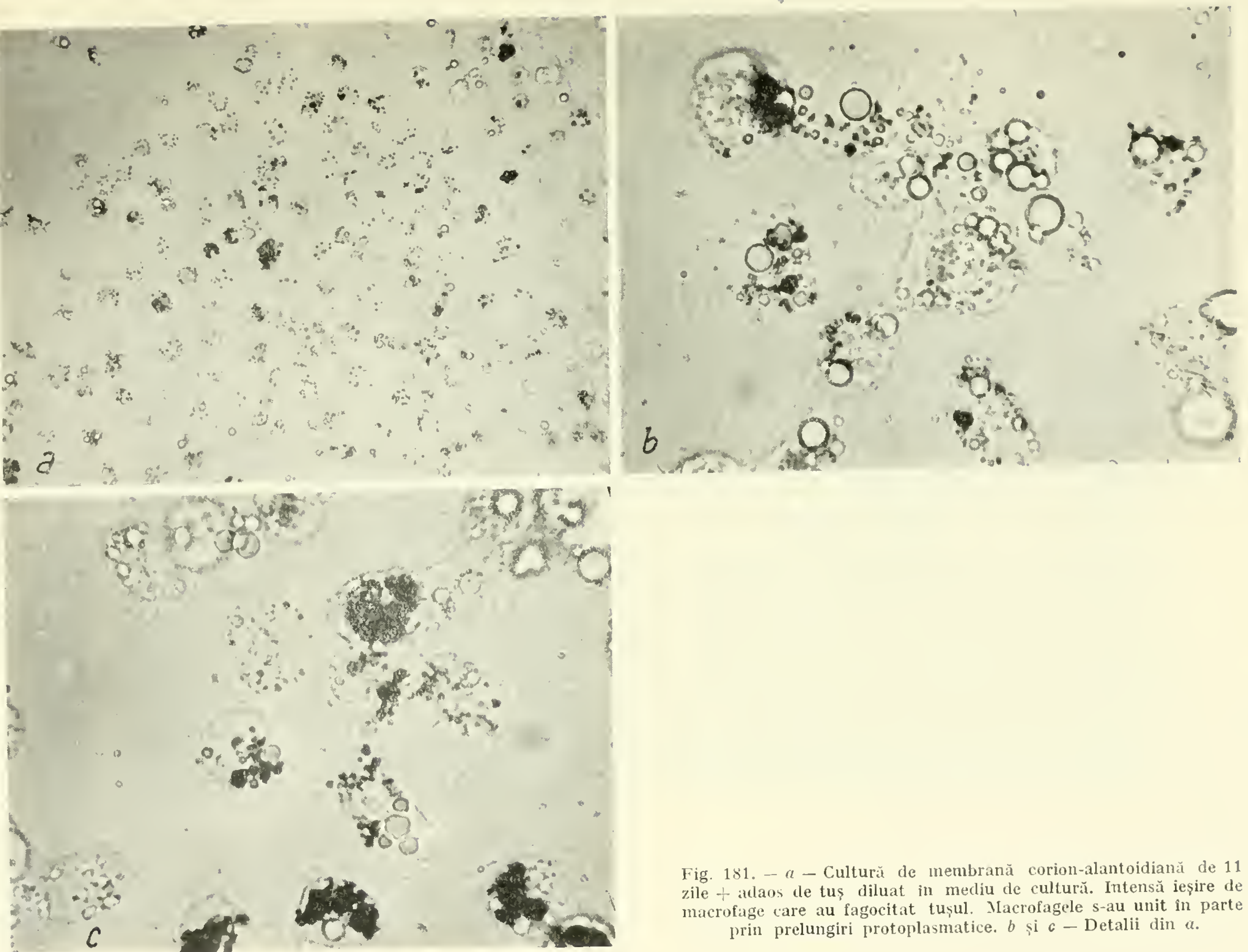


Fig. 181. — *a* — Cultură de membrană corion-alantoidiană de 11 zile + adaos de tuş diluat în mediu de cultură. Intensă ieşire de macrofage care au fagocitat tuşul. Macrofagele s-au unit în parte prin prelungiri protoplasmatice. *b* şi *c* — Detalii din *a*.

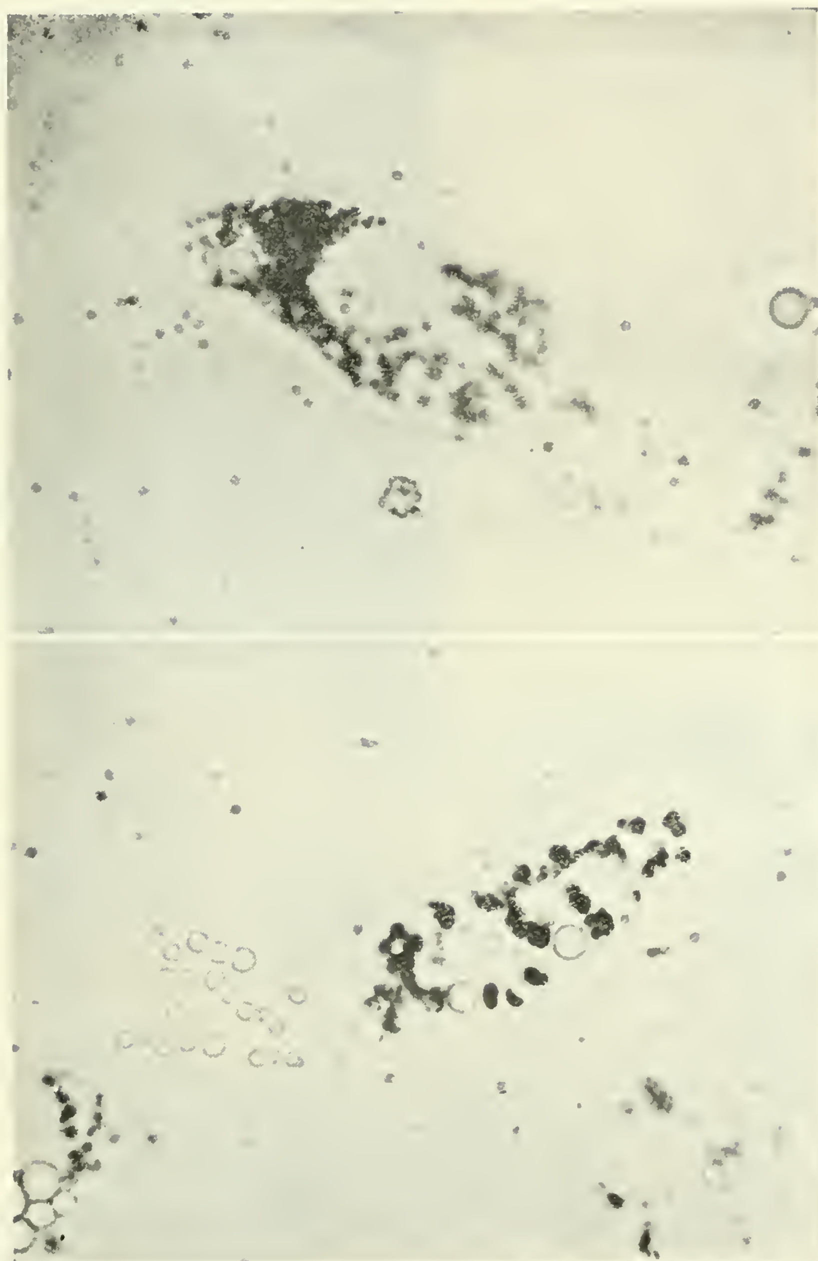
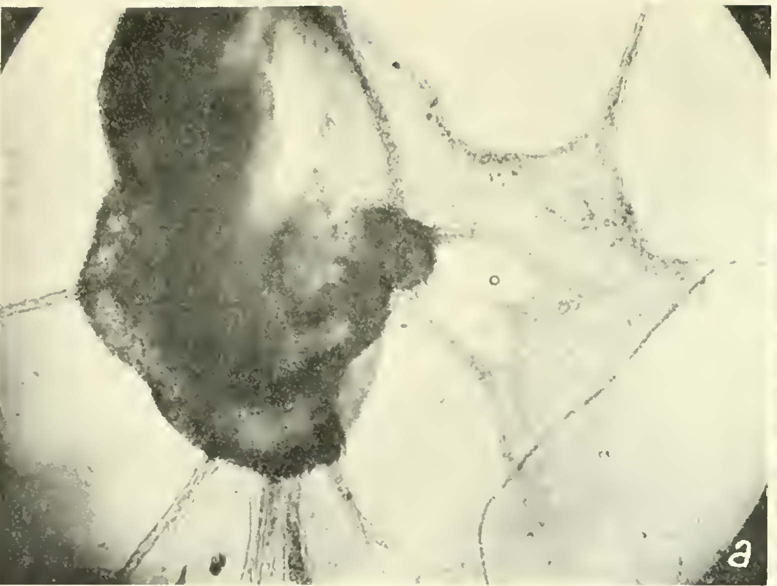
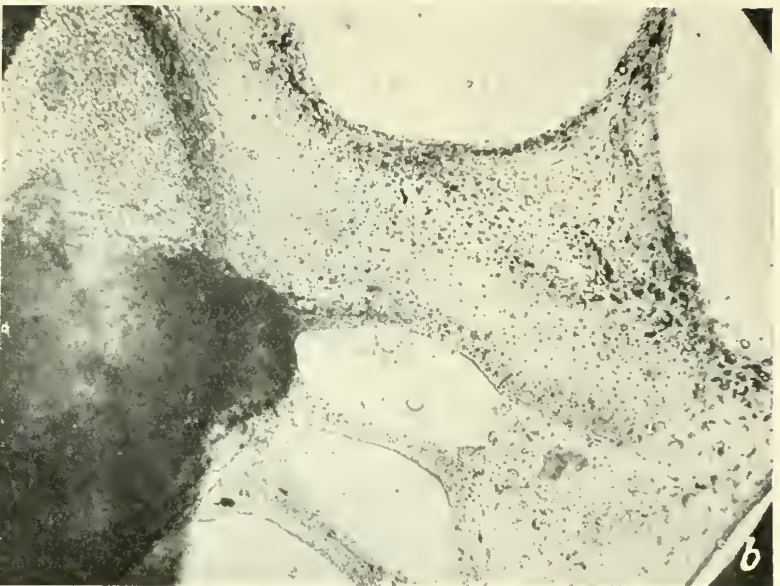


Fig. 182. — Cultură de țesut a tegumentului embrionar (Leghorn) + adaos de tuș. Fagocitoza tușului de către fibroblaști.





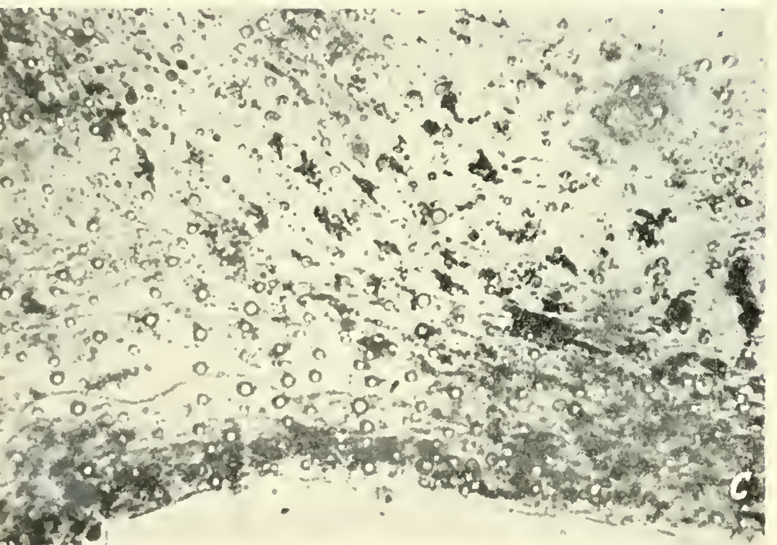


Fig. 183. — *a* — Fragment de corion-alantoidă Leghorn de 11 zile incubație, cultivat 48 de ore în plasmă heparinată. Lame epiteliale vaste. Fagocitoza tușului de către celulele epiteliale. *b* și *c* — Detalii.

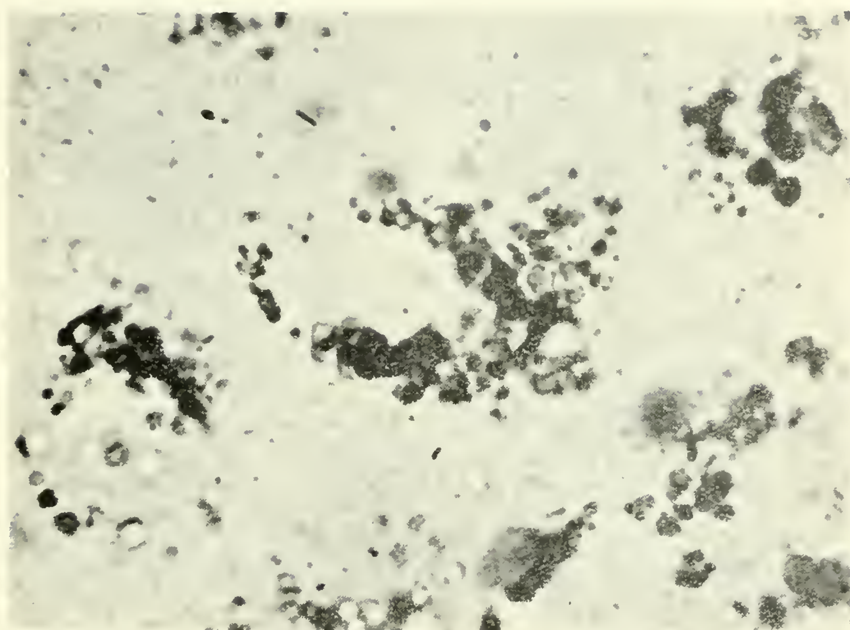


Fig. 184. — Lama epitelială dintr-o cultură de membrană corion-alantoidiană. Fagocitoza tușului introdus în mediu de cultură de către celulele epiteliale.

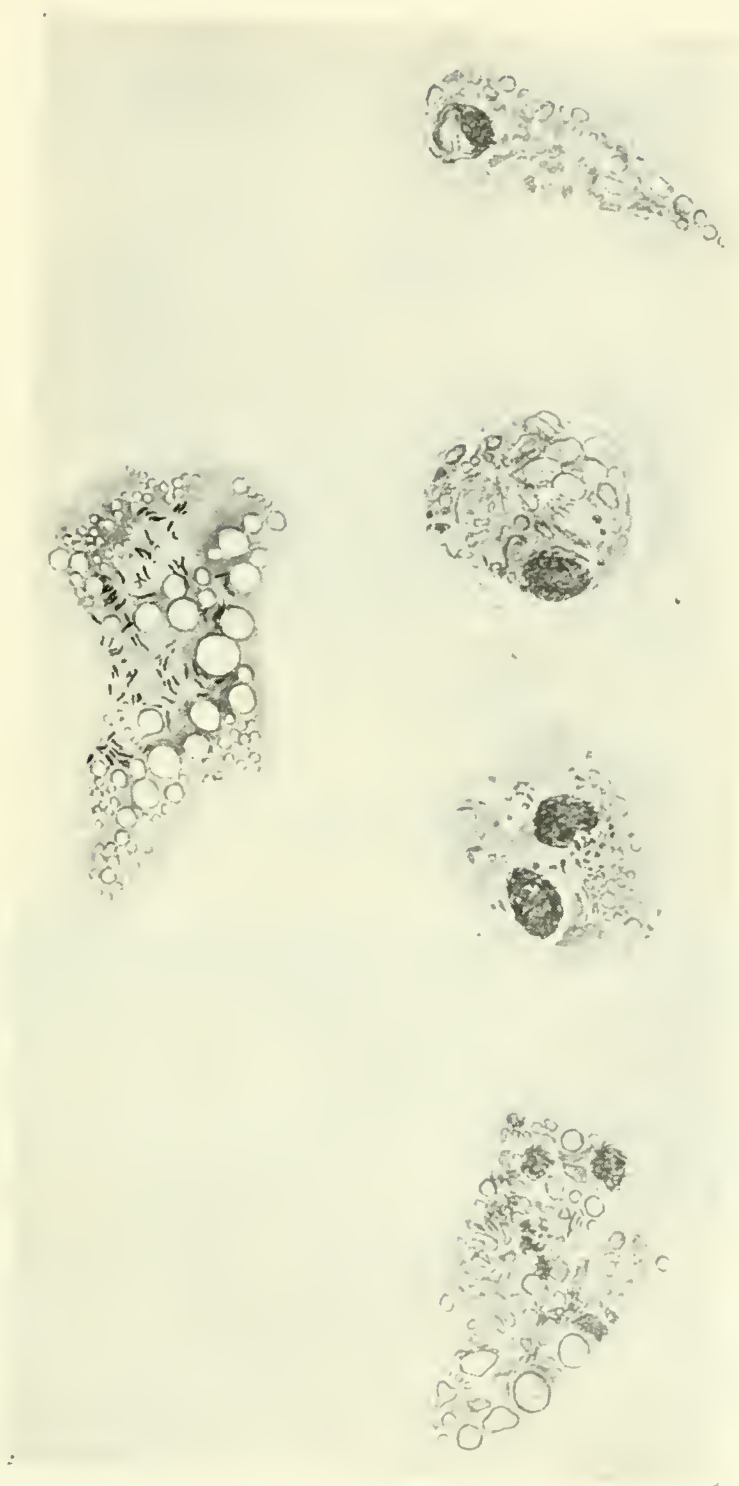
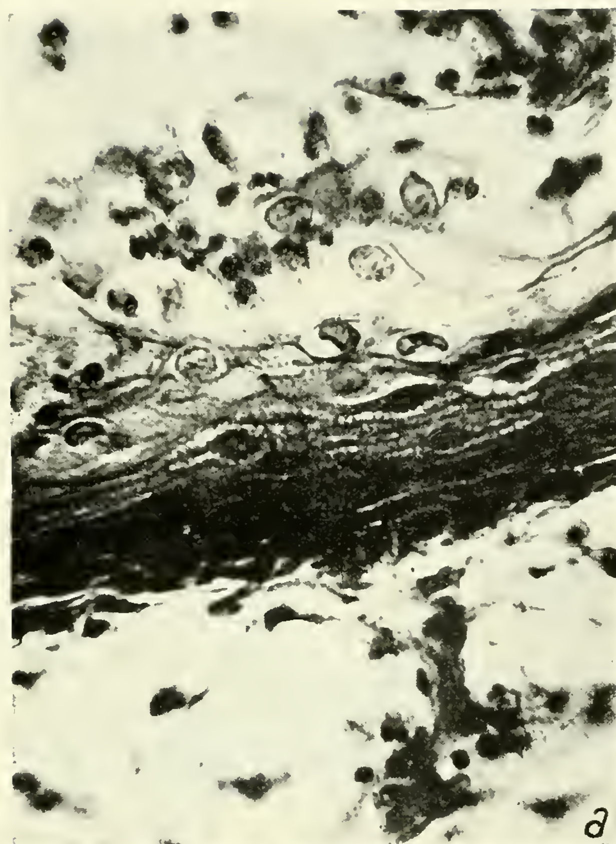


Fig. 185. — Cultură de tegument embrionar Leghorn, cu adaos de caolin şi pigment retinian în mediul de cultură. Fagocitoza fragmentelor de caolin şi a bastonaşelor de pigment retinian de către macrofage.



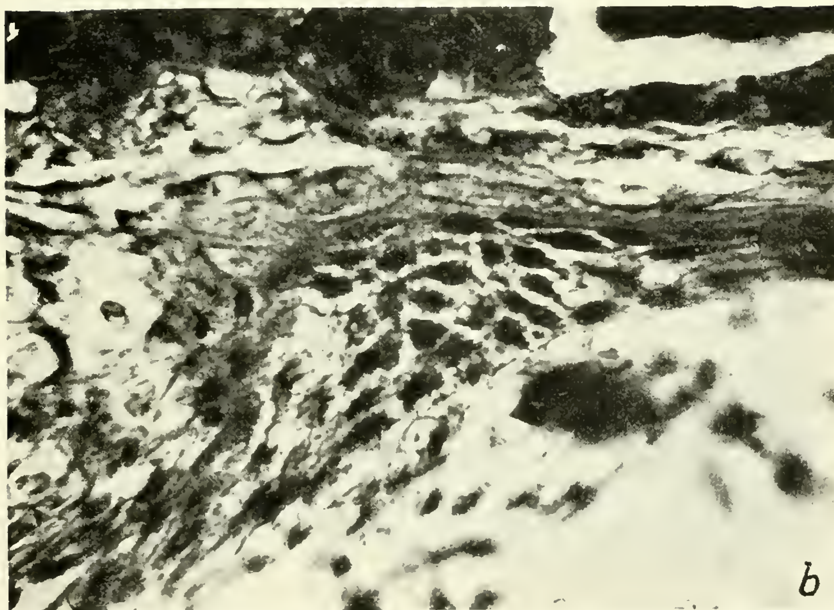


Fig. 186. — *a* — Multistratificarea şi transformarea malpighiană a epiteliului corion-alantoidian (excitant — sarcom de şoarece). *b* — Se văd clar spaţii intercelulare, punţi protoplasmatice.

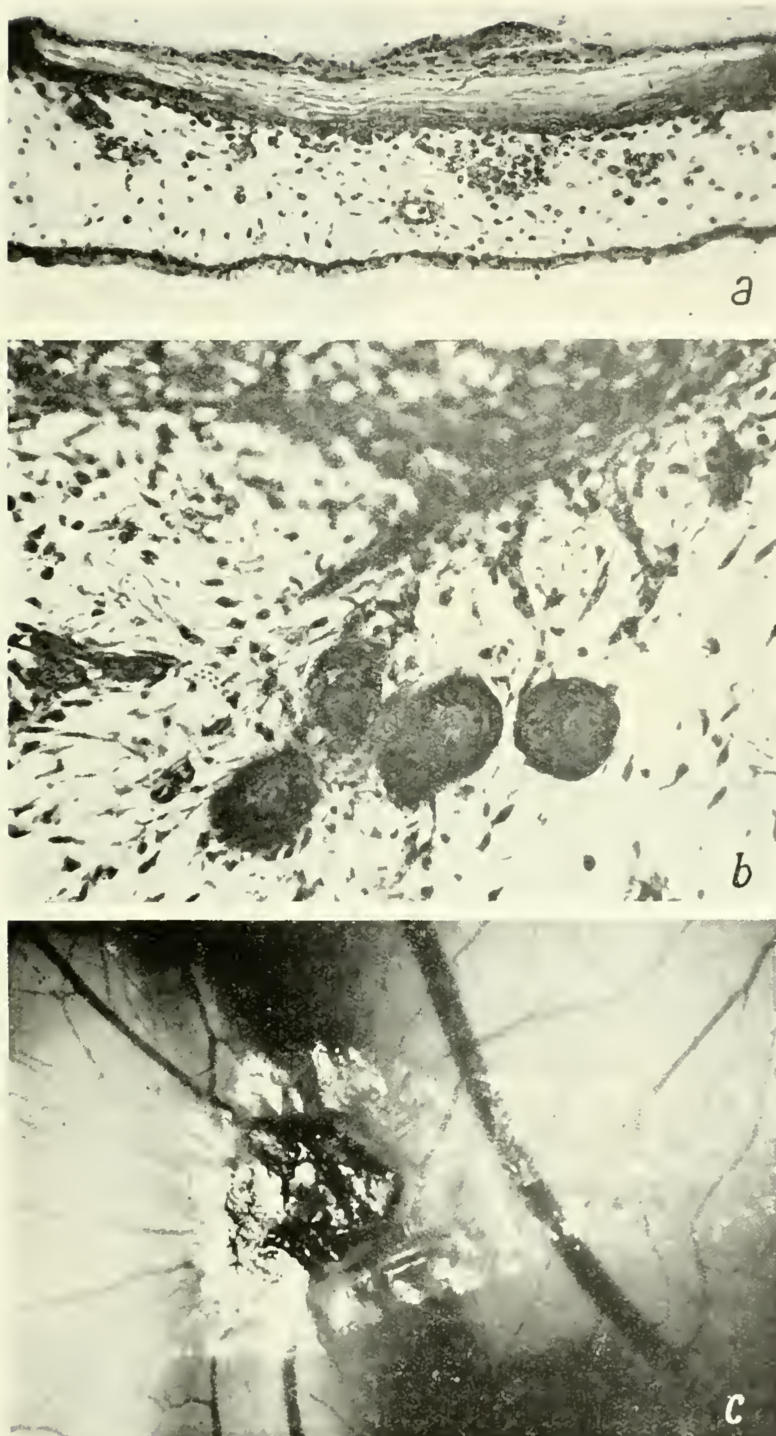
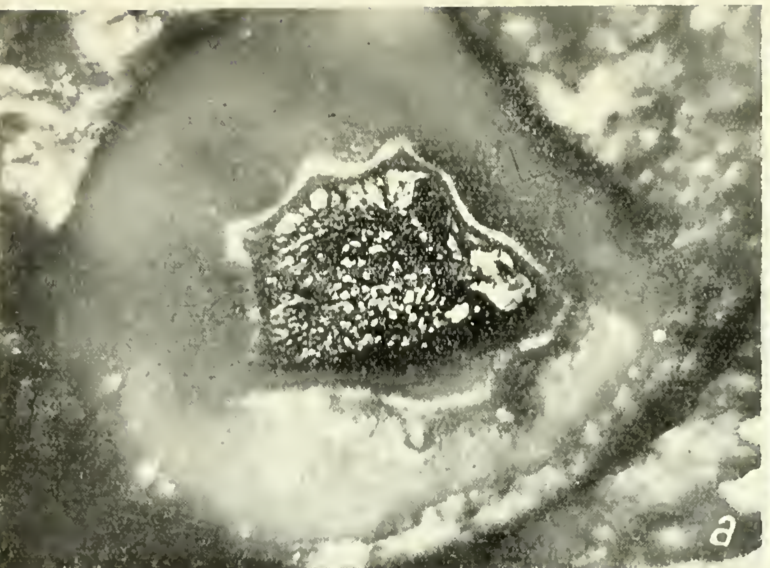
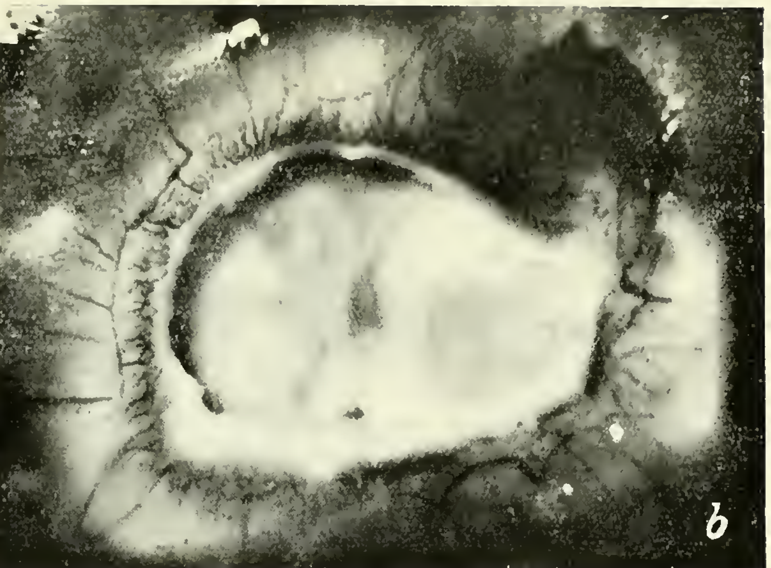


Fig. 187. — *a* — Cornificarea epiteliului corion-alantoidian (excitant — țesut tuberculos de cobai). *b* — Pătrundere de globi epiteliali în profunzimea membranei corion-alantoidiene (excitant — sarcom de șoarece). *c* — Cornificarea epiteliului corion-alantoidian (vedere *in situ* pe viu). Excitant — splină de șoarece.





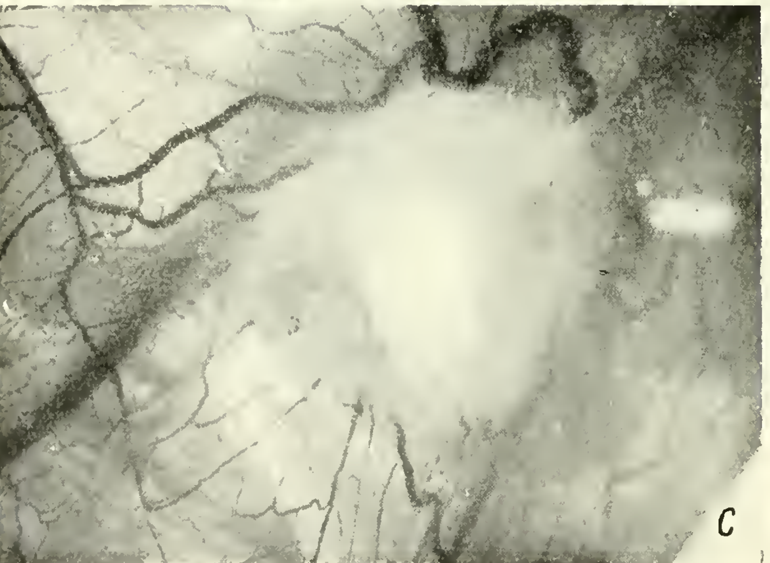


Fig. 188. — *a* — Sarcom de şoarece alb, transplantat pe membrana corion-alantoidiană în a opta zi de incubaţie. Aspect (pe viu) în a 15-a zi de incubaţie. *b* — Sarcom de şoarece alb, transplantat pe membrana corion-alantoidiană în a opta zi de incubaţie. Aspectul feţei inferioare a transplantului în a 16-a zi de incubaţie. Se vede vascularizaţia implantului. *c* — Sarcom Rous transplantat pe membrana corion-alantoidiană, în a opta zi de incubaţie. Aspect (pe viu) în a 15-a zi de incubaţie.

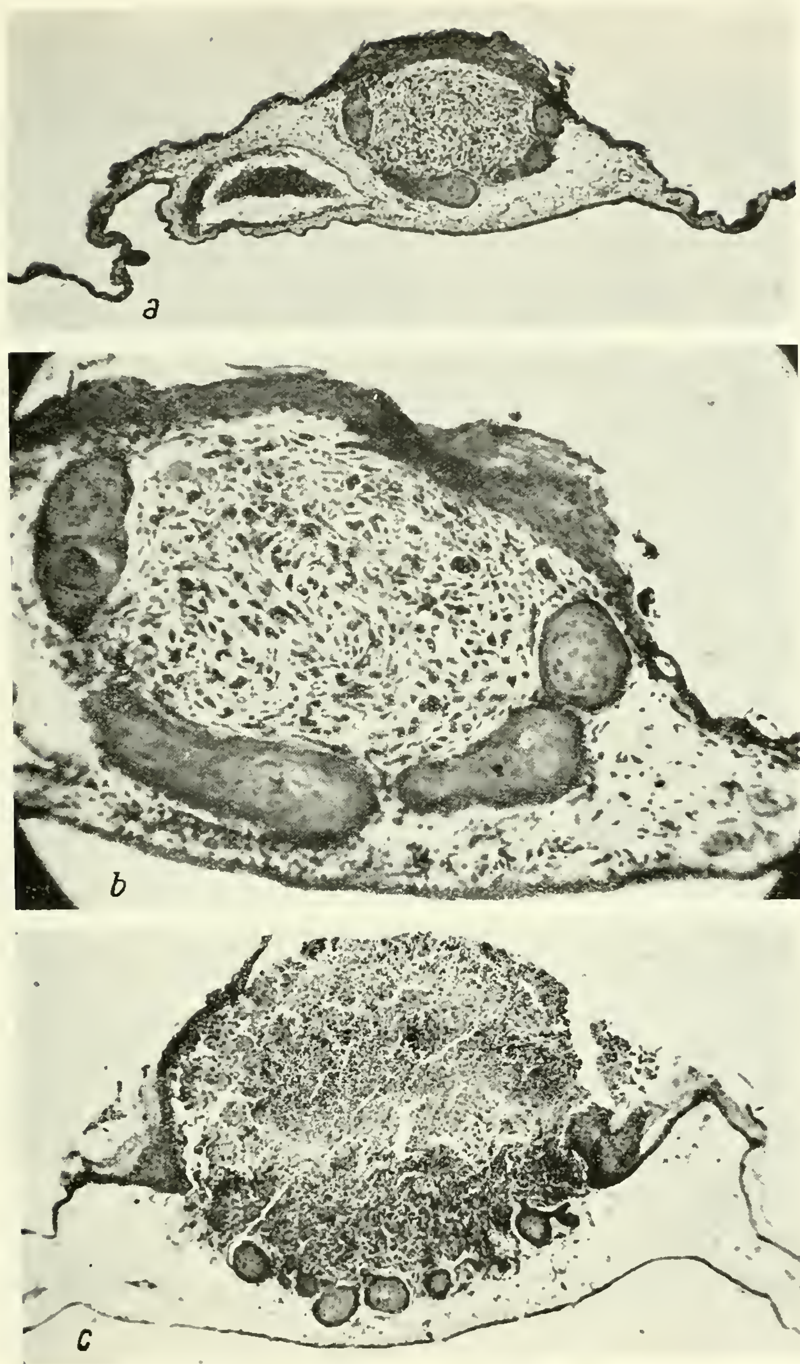


Fig. 189. — *a* — Transplant de țesut sarcomatos (șoarece alb) pe membrana corion-alantoidiană. Puternică reacție epitelială a membranei corion-alantoidiene cu formare de globi cornificați. *b* — Imagine mărită. *c* — Transplant de țesut sarcomatos (șoarece alb) pe mebrana corion-alantoidiană. Necrobioza părții superficiale a implantului. Țesut tumoral viu în contact cu globii cornificați ai epiteliului corial. Transformare malpighiană în jurul implantului.

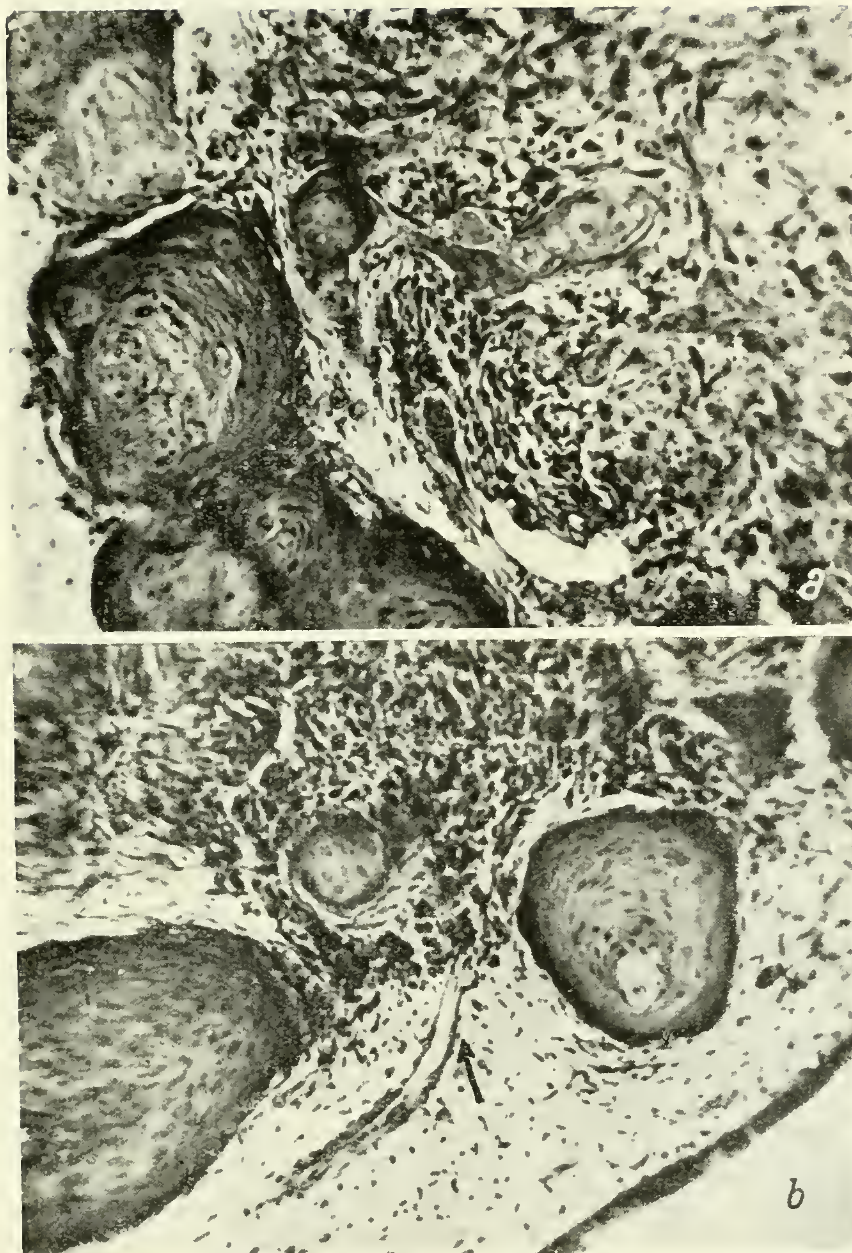
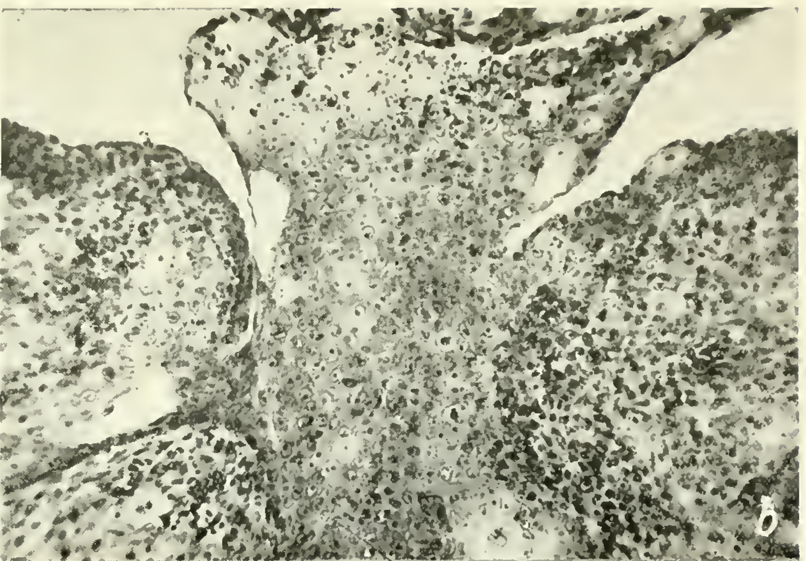


Fig. 190. — *a* — Transplant de țesut sarcomatos de șoarece alb pe membrana corion-alantoidiană. Detalii: globii cornoși și proliferare infiltrativă a epiteliului înspre masa sarcomatoasă. *b* — Vase coriale pătrund printre globii cornoși în țesutul tumoral implantat.





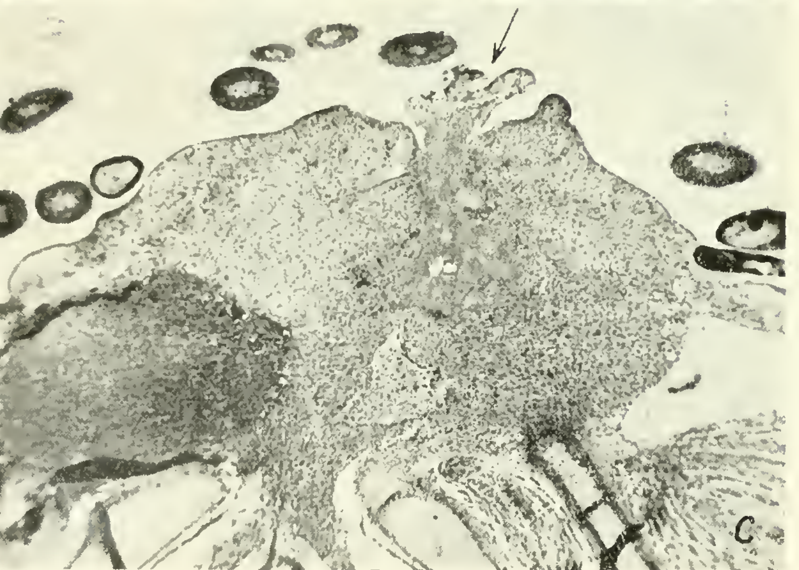


Fig. 191. — *a* — Sarcom Rous grefat pe corpul embrionului din a treia zi de incubaţie, fixat în a 12-a zi de incubaţie, *b* şi *c* — Detalii din a. *b* — Puternică reacţie epitelială, *c* — Reacţie epitelială.

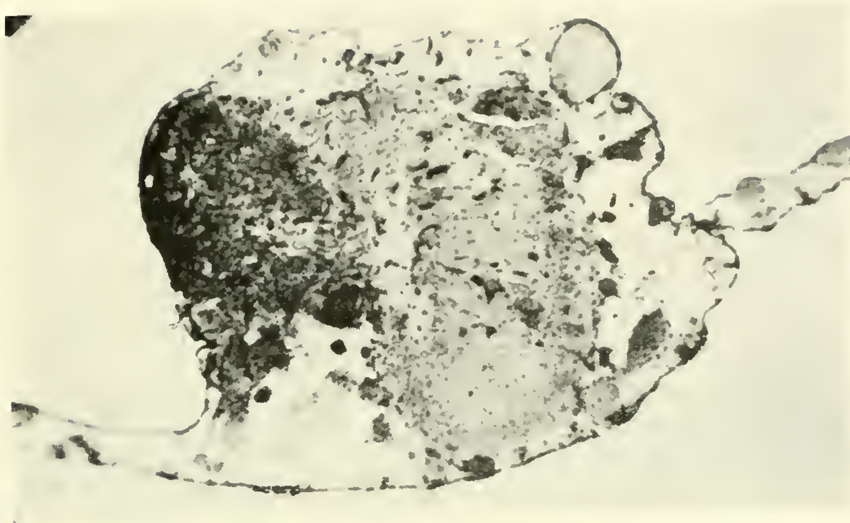


Fig. 192. — Sarcom Rous cultivat pe membrana corion-alantoidiană.



Fig. 193. — Sarcom de șoarece alb, grefat pe corpul embrionului de găină din a treia zi de incubație. Fixarea s-a făcut în a 12-a zi de incubație. Tumoarea infiltrează musculatura gazdei, din partea căreia nu se vede nici o reacție

REACTIVITATEA CORPULUI EMBRIONULUI ȘI A MEMBRANEI CORION-ALANTOIDIENE FAȚĂ DE INFECȚIA CU BACILI KOCH

În continuarea cercetărilor din capitolul precedent, în care am solicitat reactivitatea embrionului și a anexelor sale prin implantarea unor fragmente de tumori maligne în diferite părți ale complexului embrionar, trecem acum la expunerea cercetărilor noastre, efectuate împreună cu colaboratorul nostru St. Sandor, asupra efectului infecției cu bacili Koch a diferitelor părți ale complexului embrionar (vezi și disertația de candidat în științe medicale a lui St. Sandor).

Cercetările descrise în capitolul precedent au relevat faptul că, în sînul complexului embrionar, corpul embrionului și anexele sale cenogenetice, în primul rînd membrana corion-alantoidiană, prezintă simultan nete diferențe de reactivitate, atît ca formă, cît și mai ales ca intensitate.

Aceasta s-a manifestat în cazul particular al implantelor tumorale prin reacția diferită a epiteliului membranei corion-alantoidiene și a tegumentului embrionar, precum și prin lipsa reacției inflamatoare în corpul embrionar, prezentă însă în mezenchimul membranei corion-alantoidiene. Totodată s-au observat unele forme ale reacției epiteliale induse de implantul tumoral, care depășeau limitele reacțiilor nespecifice obișnuite ale epiteliului corion-alantoidian față de diferiți excitanți (mecanici, chimici, biotici etc.), precum și reacția caracteristică a epidermului embrionar față de implantul tumoral de origine virotică (sarcom Rous).

Diferența dintre reactivitatea corpului embrionar și a membranei corion-alantoidiene se manifestă și printr-o mai intensă creștere a tumorilor implantate în corpul embrionar, față de cea a tumorilor implantate pe membrană. În privința folosirii unor implante din ce în ce mai îndepărtat din punct de vedere sistematic față de gazdă (de exemplu, tumoarea de găină pe de o parte și de șoarece pe de altă parte), observațiile din capitolul precedent au arătat o reacție mai intensă și mai multiformă față de implante heterogene decît față de implante homeospecifice sau chiar homeorasiale.

În scopul studierii formelor de reactivitate față de infecții în cursul dezvoltării ontogenetice a complexului embrionar de găină, am utilizat infecția cu bacili Koch de tip bovin, uman și în cîteva cazuri de tip aviar. Experiențele s-au făcut pe embrionul de găină de rasă Leghorn și în cîteva cazuri de rasă Plymouth. Respectînd principiul metodologic enunțat și în capitolele precedente, am întrebuințat o gamă de intervenții experimentale, comparînd infecția membranei corion-alantoidiene cu cea a corpului embrionar.

Infecția bacteriană a oului de găină a fost studiată de numeroși cercetători, atît în condiții naturale, cît și experimentale. Datele referitoare la infecția bacteriană a ouălor în oviduct sau după pontă (cu toate divergențele considerabile) sînt totuși concludente prin faptul că recunosc posibilitatea pătrunderii agenților patogeni prin coajă sau infecția oului în oviduct înaintea formării cojii. Această constatare are, după părerea noastră, o deosebită importanță biologică. Se poate emite ipoteza că, în cursul dezvoltării filo- și ontogenetice, complexul embrionar venind în contact, în repetate rînduri, cu diferiți agenți patogeni, s-ar adapta într-un fel sau altul la „condițiile neobișnuite" reprezentate prin acești agenți. Pentru această ipoteză pledează și prezența în albuș a unei substanțe bactericide. Experiențele noastre urmăresc, între altele, studiul expresiei reactivității „directe" ca manifestare morfologică în diferitele părți componente ale complexului embrionar. Presupunem să găsim această reactivitate dezvoltată pe baza unei adaptări

filogenetice la nivelul substraturilor vii, superficiale, ale complexului embrionar, care vin în primul rînd în contact cu agenți exogeni.

Infecția bacteriană experimentală a oului de găină este pe larg discutată în literatură. Majoritatea lucrărilor cercetează însă mai puțin reactivitatea substratului viu, manifestările morfologice ale acestei reactivități, și mai mult influența substratului asupra agenților patogeni, virulența și cultivabilitatea acestora etc. Relativ puține lucrări se referă la infecția experimentală cu bacilul tuberculozei. Și aceste cercetări s-au efectuat mai mult cu scopul de a studia cultivabilitatea agentului în oul de găină, sau pentru a controla pe un substrat viu acțiunea directă a antibioticelor și a preparatelor chimioterapice. Numai puține cercetări se ocupă de morfologia substratului embrionar infectat, acestea studiind doar membrana corion-alantoidiană sau sacul amniotic și numai în rare cazuri însuși corpul embrionar.

I

Pentru realizarea infecției tuberculoase experimentale a diferitelor părți componente ale complexului embrionar am efectuat cu St. Sandor, în primul rînd, cîteva serii de experiențe cu infecția directă a membranei corion-alantoidiene. Agentul patogen a fost pus în contact cu membrana, fie prin răspîndirea unei picături de suspensie bacilară (1—2 mg/ml în soluție clorurо-sodică izotonică) pe suprafața acesteia (în mai puține cazuri), fie prin implantarea pe membrana corion-alantoidiană a unui țesut embrionar (membrană corion-alantoidiană de găină de 8—14 zile incubație), scăldat într-o suspensie asemănătoare de bacili Koch. Într-un singur caz infecția s-a efectuat prin implantarea unor fragmente de organe cu leziuni tuberculoase evidente, provenite de la un cobai infectat. În seriile experimentale de mai sus am folosit o tulpină de bacili Koch de tip bovin.

Infecția directă a membranei corion-alantoidiene a pus în evidență o serie de fenomene caracteristice, evidențiind formele morfologice de reacție ale acestei membrane față de agentul patogen al tuberculozei.

Cea mai puternică reacție s-a produs în cazul implantului de organ tuberculos de cobai, deci în cazul implantării unui țesut viu, infectat, provenit din organismul unui mamifer. O reacție mai slabă s-a produs în cazurile implantului corion-alantoidian scăldat în suspensie bacilară, deci în cazul unui implant de țesut homeospecific.

Cea mai slabă reacție s-a produs la infecția prin picătura de suspensie bacilară.

Reacția membranei a început să se manifeste în general la 4—5 zile după infecție, deci la embrioni de 12—13 zile de incubație, infecția efectuîndu-se la embrioni de 8—9 zile de incubație. Amintim că, în această perioadă de incubație, membrana corion-alantoidiană este pe deplin formată, ocupînd o porțiune însemnată din suprafața internă a oului și constînd din două pături epiteliale monostratificate de origine ecto- și endodermală, între care găsim mezenchimul contopit al corionului și al veziculei alantoidiene.

Am observat zilnic modificările macroscopice și micro-macroscopice ale membranei infectate, cu lupa binoculară, prin fereastra tăiată în coaja oului începînd din a doua zi după infecție, iar la diferite intervale de timp am completat aceste observații pe viu cu preparate microscopice.

La 4—5 zile după infecție, membrana începe să arate o îngroșare și opacificare din ce în ce mai pronunțate. În cazul implantelor, acest fenomen începe în primul rînd în jurul acestora, cuprinzînd pe urmă treptat o zonă întinsă a membranei. Concomitent se pot observa în mai multe cazuri tulburări circulatoare în micile vase și capilarele membranei : fenomene de prestază sau stază, excluderea parțială sau completă a unor teritorii vasculare

din circulație. Începînd cam de la a 10-a zi după infecție, deci în a 18-a sau a 19-a zi de incubație, se poate observa formarea treptată a unor noduli circumscriși, albicioși, diseminați pe suprafața membranei, păstrînd în general, dar nu totdeauna, așezarea perivasculară (fig. 194). Începînd cu mărimea unui vîrf de ac, acești noduli ajung în unele cazuri la dimensiuni considerabile, iar uneori formează chiar excrescențe masive neregulate, confluente (fig. 195). În jurul nodulilor diseminați, mai ales în primele lor faze de dezvoltare, se observă convergența radiară a vaselor alantoidiene care se pierd în zona albicioasă, opacă, a nodulului.

La examenul microscopic se poate observa o întreagă gamă de modificări, în esență identice la toate metodele folosite de noi, prezentînd doar intensități diferite.

În țesutul mezenchimal al membranei corion-alantoidiene se observă la început mici infiltrate compuse din celule rotunde, uneori cu granulații eozinofile, alteori fără acestea, în majoritatea cazurilor, în jurul capilarelor sau vaselor mici (fig. 196 și 197). Concomitent se observă multe celule eozinofile polinucleare sau mononucleare în lumenul capilarelor din zona respectivă (acest fenomen este general pentru toate etapele de dezvoltare ale procesului).

Treptat, aceste infiltrate devin mai dense, se măresc, căpătînd aspectul unor noduli inflamatori bine circumscriși, păstrîndu-și deocamdată componența celulară amintită. În zona nodulilor formați se poate observa o netă reacție a substanței fundamentale argirofile, sub forma unei rețele de fibre argirofile din ce în ce mai dense (impregnație argentică Papp). Cînd depășesc o anumită mărime, nodulii inflamatori prezintă noi caracteristici. Componența celulară devine mai variată, apar și elemente histiocitare sau chiar (mai rar) fibroblaști, fibrocite și fibre conjunctive. Centrul nodulilor arată, în multe cazuri, zone de necrobioză sau necroză (cazeificări) (fig. 198). În profunzimea țesutului inflamator, mai ales în jurul focarelor necrobiotice și necrotice, se observă — în unele cazuri — formarea de simplaști multinucleați, de formă variabilă, așezați uneori radiar în jurul zonelor cazeificate (fig. 199).

Epiteliul membranei corion-alantoidiene suferă în zona leziunilor o serie de modificări caracteristice care ajung la diferite grade de dezvoltare și intensitate. Cea mai simplă schimbare în structura epiteliului, de obicei în zonele cu infiltrate incipiente sau noduli nu prea mari, constă într-o îngroșare, avînd la bază o pluristratificare a epiteliului (normal unistratificat). Reacția mai pronunțată se manifestă printr-o metaplazie malpighiană evidentă, dînd naștere la un epiteliu pluristratificat pavimentos cornificat, caracteristic (fig. 200). Acest fenomen se observă deasupra nodulilor inflamatori mai puternic dezvoltați, precum și în jurul implantelor prinse. Epiteliul metaplazic înconjură și delimitează, în aceste cazuri, fragmentul implantat necrotic.

Mai rar, în special în reacțiile inflamatoare foarte puternice (de exemplu, în cazul implantului de țesut tuberculos de cobai), reacția epitelială nu se oprește la simpla metaplazie malpighiană. În aceste cazuri observăm pătrunderea epiteliului în profunzimea țesutului inflamator, respectiv a mezenchimului membranei, sub formă de trabecule înguste de celule epiteliale, uneori mai late la capătul profund, a căror legătură cu epiteliul metaplazic se poate urmări în unele preparate. Uneori, legătura s-a pierdut și observăm insule epiteliale neregulate sau rotunjite, independente de epiteliul de suprafață. În aceste insule epiteliale nu se observă atipii celulare, celulele păstrîndu-și legătura lor normală. În unele preparate, formațiunile descrise iau un aspect chistic, prezentînd în interiorul lor un lumen (fig. 201).



Am avut ocazia să studiem reacția membranei corion-alantoidiene față de infecția tuberculoasă și în condiții diferite de cele relatate mai sus. În mai multe serii de experiențe, care vor fi analizate în acest capitol, bacilii tuberculozei au fost răspîndiți în lichidele embrionare, începînd cu a treia zi de incubație, deci într-o perioadă în care formarea veziculei alantoidiene, parte componentă a viitoarei membrane corion-alantoidiene, abia începe. Și în aceste cazuri am observat reacția caracteristică a membranei începînd aproximativ din a 13-a zi de incubație, deci la 10 zile după pătrunderea agentului patogen. Această reacție seamănă morfologic foarte mult cu cea descrisă mai înainte: formare treptată de infiltrate și noduli, reacție celulară eozinofilă rotundocelulară, histiocitară etc., necrobioze și necroze centrale, uneori formare de simplaști multinucleați, reacție puternică din partea substanței fundamentale argirofile.

Spre deosebire însă de cele observate în seriile anterioare, în aceste cazuri nu am observat (cu excepția unui singur caz, unde infecția s-a făcut cu bacili Koch de tip uman), reacția caracteristică a epiteliului. Chiar în prezența unor noduli puternic dezvoltați, masivi și multipli, epiteliul membranei corion-alantoidiene rămîne unistratificat și prezintă doar rareori o foarte ușoară îngroșare.



Putem constata deci că, în cazurile infecției directe cu picătură de suspensie bacilară sau implant infectat în a opta sau în a noua zi de incubație, membrana corion-alantoidiană reacționează puternic prin formarea treptată a unor infiltrate și noduli inflamatori caracteristici, cu formarea concomitentă a unor reacții epiteliate de intensitate diferită. Infecția membranei corion-alantoidiene, chiar de la începutul formării ei, duce la o reacție inflamatoare asemănătoare, însă fără producerea concomitentă (cu rare excepții) a unei reacții epiteliale.

Trebuie să accentuăm îndeosebi asupra caracterului difuz, cu propagare largă, al reacției țesuturilor membranei corion-alantoidiene.

II

Conform principiului experimental enunțat anterior, am efectuat într-o altă serie de experiențe infectarea directă a corpului embrionar. Pentru realizarea acestui scop ne-am folosit de metoda mielorahischizisului în a treia zi de incubație.

În cazurile în care dezvoltarea nodulului local nu este evidentă, se observă doar infiltrate la locul intervenției. În organele interne ale embrionilor nu se pot decela semnele morfologice ale unei inflamații specifice. Unele reacții celulare perivasculare nespecifice observate în anumite organe vor face obiectul unor cercetări viitoare.

Este interesantă comportarea epiteliului embrionar din zona nodulului inflamator local. Nici epiteliul tegumentar supraiacent nodulului, nici epiteliul zonei înconjurătoare nu arată modificări însemnate. Nu am găsit în nici un caz reacția epitelială puternică, observată deasupra implantelor de tumori de origine virotică (sarcom Rous, vezi capitolul precedent). Mai mult decît atît, corespunzător aspectului observat cu ochiul liber sau cu lupa binoculară, papilele penelor embrionare cresc deasupra nodulului, iar în unele preparate se poate observa legătura intimă a acestora cu țesutul inflamator, care poate pătrunde chiar în baza acestor papile (fig. 210).

Putem constata deci că, în condițiile infecției directe a corpului embrionar (prin mielorahischizis experimental și implantări de țesut embrionar, scăldat în suspensie de

bacili Koch), se formează doar un nodul inflamator local (la locul intervenţiei) asemănător celor observaţi în infecţia membranei corion-alantoidiene. În afara unor mici infiltrate celulare din imediata apropiere a nodulului local, procesul inflamator nu arată nici o tendinţă de propagare sau generalizare în corpul embrionului. Epiteliul tegumentar embrionar nu arată nici o modificare apreciabilă în sensul unei reacţii caracteristice (nici chiar în imediata apropiere a nodulului inflamator) (fig. 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208 şi 209).

III

Experienţele în care am realizat infecţia directă a corpului embrionar prin metoda mielorahischizisului şi implant infectat de ţesut embrionar ne-au dat prilejul să observăm reacţii diferite ale părţilor componente ale complexului embrionar faţă de acelaşi agent patogen. După cum reiese din analiza faptelor observate şi descrise separat în cele două subcapitole precedente, reacţia faţă de infecţia tuberculoasă a corpului embrionar, pe de o parte, şi a membranei corion-alantoidiene, pe de alta, diferă foarte mult. Pe cînd membrana corion-alantoidiană, în condiţiile infecţiei directe, reacţionează puternic prin dezvoltarea infiltratelor şi nodulilor inflamatori caracteristici, care se dezvoltă difuz în aproape întreaga membrană, precum şi prin reacţia pronunţată a epiteliului, corpul embrionar, în condiţiile aceleiaşi infecţii directe (prin mielorahischizis), nu reacţionează decît strict local, prin formarea unui nodul sau infiltrat inflamator localizat, fără reacţia concomitentă a epiteliului embrionar.

Această deosebire este şi mai evidentă în cazul infectării experimentale directe a corpului embrionului, cînd reacţionează şi membrana corion-alantoidiană. Cu toate că introducerea bacililor Koch în complexul embrionar are loc în perioada care precedă formarea veziculei alantoidiene, totuşi, în cadrul aceluiaşi complex infectat, membrana corion-alantoidiană reacţionează puternic, prin formare de noduli şi infiltrate multiple (ce-i drept, fără reacţie epitelială apreciabilă), pe cînd corpul embrionar, direct lezat şi infectat, nu reacţionează decît foarte limitat, prin fenomene inflamatoare locale.

Celelalte părţi componente ale complexului embrionar, sacul amniotic şi sacul vitelin, venind şi ele — în condiţiile noastre experimentale — în contact direct cu agenţii patogeni răspîndiţi în mod inevitabil în lichidele embrionare, reacţionează foarte slab sau de loc. În puţine cazuri, sacul amniotic prezenta cîţiva mici noduli abia vizibili, iar sacul vitelin într-un singur caz, cîţiva noduli în regiunea ombilicală, deci în zona de tranziţie dintre ţesutul membranei corion-alantoidiene şi al sacului vitelin. Chiar în cazul introducerii directe a bacilului Koch în sacul amniotic cu lezarea concomitentă a corpului embrionar (în a patra zi de incubaţie), corpul embrionar şi sacul amniotic nu prezentau leziuni, iar pe membrana corion-alantoidiană se dezvoltau leziuni puternice şi generalizate (fig. 211).

Se poate deci constata că în aceleaşi condiţii de experienţă, în cadrul aceluiaşi complex embrionar şi în acelaşi timp, diferitele părţi componente ale acestuia manifestă o reacţie net deosebită faţă de acelaşi agent patogen, în cazul nostru particular, faţă de bacilul Koch. Corpul embrionar, sacul amniotic, sacul vitelin, arată o reacţie locală slabă sau chiar inexistentă, pe cînd membrana corion-alantoidiană reacţionează puternic, generalizat, difuz.

IV

Hiporeactivitatea corpului embrionar față de bacilul Koch se evidențiază și în alte serii de experiențe efectuate de noi. Pentru infecția directă a întregului complex embrionar, dar, în primul rînd a corpului embrionar, am întrebuințat metoda injecției intravenoase. În a 12-a sau a 13-a zi de incubație, prin membrana papiracee intactă și clarificată, am injectat cu ajutorul unui ac fin de sticlă o suspensie de bacili Koch de tip bovin sau uman (circa 0,1 ml dintr-o suspensie de 2 mg/ml), într-o venă alantoidiană mai mare. Sacrificînd după 6—8 zile, embrionii injectați, deci în a 19-a sau a 20-a zi de incubație, am examinat macro- și microscopic membranele și organele embrionilor.

Membrana corion-alantoidiană prezenta în unele cazuri o oarecare îngroșare și edemațiere, cu foarte rari noduli, abia vizibili. Organele interne ale embrionilor prezentau rareori modificări macroscopice, ca focare gălbui, neregulate în ficat și mai circumscrise în splină, de obicei mărită. Examinînd microscopic organele interne, s-au găsit, mai ales în ficat și splină, leziuni necrotice și rareori infiltrate celulare, fără nici un aspect caracteristic. Într-un singur caz, în ficat, s-au găsit multipli noduli circumscriși, formați din elemente histiocitare (tipul de tubercul „epitelioid"). În general lipseau reacțiile inflamatoare caracteristice și fenomenele productive (formarea de noduli, de simplaști etc.). Pentru a controla conținutul în bacili tuberculoși virulenți al organelor embrionilor injectați, am inoculat subcutanat la cobai suspensia preparată din mai multe organe interne ale embrionilor. Într-un timp relativ scurt (circa o lună) s-a dezvoltat la acești cobai o tuberculoză experimentală tipică, generalizată.

Faptele de mai sus arată că infectarea masivă, prin circulația sanguină, a complexului embrionar nu dă naștere, în condițiile noastre de experiență, la reacții caracteristice inflamatoare, deși corpul embrionar este inundat de agenți patogeni virulenți.

Interpretarea definitivă a acestor serii de experiențe întîmpină însă—deocamdată— o serie de dificultăți. Lipsa reacției caracteristice inflamatoare a corpului embrionar s-ar putea datori și timpului relativ scurt (maximum 8 zile) care stă la dispoziția dezvoltării procesului infecțios. Este semnificativ că în aceste condiții și membrana corion-alantoidiană, care vine în mod inevitabil în contact cu bacili, atît prin răspîndirea lor în timpul injecției, cît și pe cale sanguină, arată o reacție foarte slabă sau chiar inexistentă. Sînt necesare alte cercetări, pentru a clarifica rezultatele acestor experiențe. Se impune mai cu seamă continuarea observațiilor în perioada posteclozională (cercetări în curs).

Sintetizînd rezultatele experiențelor noastre, putem desprinde următoarele constatări :

Infecția cu bacilul Koch determină pe membrana corion-alantoidiană o reacție epitelială și mezenchimatoasă.

1. În reacția epitelială a membranei corion-alantoidiene putem deosebi două componente :

a) O îngroșare simplă prin multistratificare, eventual cu fenomene de metaplazie malpighiană, care reprezintă o reacție nespecifică, generală, a epiteliului membranei corion-alantoidiene, răspuns la orice excitație mecanică, chimică, biotică etc. ce interesează suprafața acestei membrane. Faptul că această reacție se produce doar la nivelul epiteliului extern, de origine ectodermală, care este cel mai periferic strat viu al complexului embrionar, ne permite interpretarea acestui fenomen ca o reacție de adaptare, dezvoltată filogenetic, față de agenții externi care vin în contact cu acest strat epitelial.

b) O reacție epitelială simplă, nespecifică, însă de intensitate mai mare, caracterizată prin pătrunderea în adîncime a unor muguri epiteliali, formarea de perle sau insule epiteliale, uneori cu transformare chistică. Asemănător celor observate în experiențele cu implante tumorale maligne, această reacție epitelială puternică pare să fie cauzată, atît de implant, cît și de acțiunea agenților patogeni introduși împreună cu acesta. Pentru rolul deosebit al implantului pledează și faptul că cea mai puternică reacție s-a observat în cazul implantului heterogen, provenit de la un mamifer (cobai), această reacție devenind mai slabă în cazul implantului infectat homeospecific (membrana corion-alantoidiană de găină) și în cazul infecției cu simpla picătură de suspensie bacilară. Un gradient asemănător s-a observat de altfel și în experiențele cu implante tumorale heterogene (de la mamifer) și homeospecifice (sarcom Rous).

În legătură cu reacția epitelială a membranei corion-alantoidiene se remarcă încă un aspect interesant : este vorba de lipsa acestei reacții, cînd formarea însăși a membranei are loc într-un mediu infectat cu bacili Koch, începînd cu a treia zi de incubație, deci la începutul formării veziculei alantoidiene. Acest fenomen, observat în repetate rînduri în experiențele cu mielorahischizis experimental și implant infectat, pune o problemă care nu se poate încă rezolva pe baza materialului nostru de pînă acum. Pierde oare infecția bacilară caracterul ei de „excitant neobișnuit" pentru epiteliul membranei corion-alantoidiene în condițiile dezvoltării acesteia într-un mediu infectat ?

2. Spre deosebire de epiteliul membranei corion-alantoidiene, epidermul corpului embrionar nu arată o reactivitate în sensul celei observate la nivelul membranei. Nici intervenția mecanică a mielorahischizisului experimental, nici dezvoltarea nodulului inflamator local, nu produce schimbarea structurii normale a epiteliului tegumentar, care chiar în porțiunea direct supraiacentă leziunii locale și corespunzătoare intervenției anterioare, își păstrează aspectul normal. Papilele penelor, în regiunea afectată, se dezvoltă de asemenea normal.

3. Indiferent de perioada în care vine în contact cu agentul patogen (bacilul tuberculozei), mezenchimul membranei corion-alantoidiene reacționează prin treptata dezvoltare a unei reacții inflamatoare, sub forma unor infiltrate rotundo-celulare, predominant eozinofile, perivasculare și difuze, care duc ulterior la formarea unor noduli caracteristici cu necroze centrale și simplaști. Concomitent se observă o puternică neoformare de substanță fundamentală argirofilă.

Se observă în mod deosebit caracterul difuz al acestei reacții, care se răspîndește, în majoritatea cazurilor, pe aproape întreaga suprafață a membranei corion-alantoidiene.

4. Reacția mezenchimului se manifestă și în corpul embrionar. Spre deosebire însă de reacția intensă, difuză, a membranei corion-alantoidiene, dermul embrionului nu prezintă decît infiltrate rotundo-celulare și eozinofile răzlețe în stricta apropiere a implantului infectat. După părerea noastră, nodulul inflamator caracteristic, dezvoltat în unele cazuri la locul implantului, reprezintă — în mare parte — restul țesutului implantat și în mai mică măsură reacția mezenchimului gazdei. Infiltratele amintite se găsesc numai în apropierea nodulului local. Nu s-au observat generalizări.

II. Ca și în cercetările anterioare citate, experiențele descrise în acest capitol au arătat neta diferență dintre manifestarea morfologică a reactivității corpului embrionar, pe de o parte, și a membranei corion-alantoide, pe de altă parte.

Această diferență evidentă confirmă unele principii de ordin biologic și patologic general.

1. S-a demonstrat că dezvoltarea unei leziuni (în cazul nostru, de natură inflamatoare, specifică) depinde, în foarte mare măsură, de gradul de reactivitate al substratului viu. Cu toată prezența în țesuturi a agentului patogen (în cazul nostru, bacilul tuberculozei), leziunile se dezvoltă în strictă dependență de gradul de reactivitate al diferitelor părți componente ale complexului embrionar.

2. Faptele experimentale arată că, în afară de influențele generale umorale și neuro-umorale, active în totalitatea complexului embrionar, reactivitatea diferitelor părți componente depinde și de anumiți factori locali. Altfel nu s-ar putea explica diferența care se manifestă între reactivitatea membranei corion-alantoidiene și a corpului embrionar. Credem că factorul local al reacției de adaptare are o însemnătate deosebită în special în membrana corion-alantoidă, lipsită de inervație și în legătură doar umorală cu restul complexului embrionar. „Gradul" localului și al generalului (D a v î d o v s k i) în dezvoltarea ontogenetică a reactivității embrionare, precum și legătura dintre acestea, necesită încă un studiu amănunțit și multilateral.

BIBLIOGRAFIE

1. B l o c h F. et C o s t e l L., *Réaction de la membrane chorio-allantoïde de l'embryon de poulet aux bacilles tuberculeux bovins,* C. R. Soc. biol. Paris, 1938, t. 128, nr. 22, p. 849.
2. B u d d i n g h J. a. P o l k A., *Experimental Meningococcus Infection of the Chick Embryo,* J. of Exp. Med., 1939, nr. 70, p. 425.
3. — *The Pathogenesis of Meningococcus Infection in the Chick Embryo,* J. of. Exp. Med., 1939, t. 70, p. 499.
4. — *A Study of Passive Immunity to Meningococcus Infection in the Chick Embryo,* J. of Exp. Med., 1939, nr. 70, p. 511.
5. C a l m e t t e A., *L'infection bacillaire et la tuberculose,* Paris, 1936.
6. C a n a t E. H. a. O p i e F. L., *Inflammation in Embryonic Life,* Am. J. of Pathol., 1943, t. 19, p. 371.
7. C o s t e l L. et B l o c h F., *Réaction de la membrane chorio-allantoïde de l'embryon de poulet au BCG,* C. R. Soc. biol., Paris, 1938, t. 129, p. 1094.
8. — *Réaction de la membrane chorio-allantoïde de l'embryon de poulet aux bacilles tuberculeux humains et aviaires,* C. R. Soc. biol., Paris, 1938, t. 128, p. 40.
9. E g g e r t h A. H., D r e s h e r E. a. M c O s k e r V. C., *Infection of Chick and Duck Embryos with Tubercle Bacilli,* Am. Rev. of Tub., 1948, t. 57, p. 632.
10. E m m e r t E. W., *The Tuberculostatic Action of Streptothricin and Streptomycin with Special Refernce to the Action of Streptomycin on the Chorio-allantoic Membrane of the Chick Embryo,* Publ. Health Rep., 1945, t. 60, p. 1415.
11. E m m e r t E. W. a. S e i b e r t F. B., *The Effect of Tuberculous and Sensitized sera and Serum Fractions on the Development of Tubercles in the chorio-allantoic Membrane of the Chick,* J. of Immunol., 1945, t. 50, p. 143.
12. E m m e r t E. W. a. S m i t h M. I., *The Chorio-allantoic Membrane of the Chick Embryo as a Medium for Testing the Virulence of Tubercle Bacilli,* Am. Rev. of Tub., 1943, t. 47, p. 427.
13. F i t e G. L. a. O l s o n B. J., *Infectivity of Mycobacteria for Chorio-allantoic Membrane of Chick Embryo,* Publ. Health Rep., 1944, t. 59, p. 1413.
14. F r a n c i s J., *The Chick Embryo in Chemoterapeutic Research,* Proc. Roy. Soc. Med., oct. 1946, vol. XXXIX, nr. 12.
15. G a l l a w a n M., *Encephalitis and Meningitis in the Chick Embryo Following Inoculation of the Chorio-allantoic Membrane with H. Influenzae,* Am. J. of Pathol., 1937, nr. 13, p. 911.
16. G a l l a w a n M. a. G o o d p a s t u r e F. W., *Infection of Chick Embryos with H. Pertussis Reproducing Pulmonary Lesions of Whooping-Cough,* Am .J. of Pahtol., 1937, nr. 13, p. 927.
17. G o l d s w o r t h y N. E., a. M o p p e t t W., *The Reaction of the Chorio-allantoic Membrane of the Chick to Certain Physical and Bacterial Agents,* J. Pathol. and Bacteriol., 1935, nr. 41, p. 529.

18. Goodpasture E. W., *Some Uses of the Chick Embryo for the Study of Infection and Immunity*, Am. J. of Hyg., 1938, t. 28, p. 111.
19. Goodpasture E. W. a. Anderson K., *The Problem of Infection as Presented by Bacterial Invasion of the Chorio-allantoic Membrane of Chick Embryos*, Am. J. of Pathol., 1937, t. 13, p. 149.
20. Grossfeld I., *Handbuch der Eierkunde*, Berlin, Springer, 1938.
21. Knothe H., *Das Verhalten von aeroben Bakterien in gebrühten Hünereiern*; I, Zbl. f. Bakteriol., 1952, t. 158, nr. 6, p. 383; II, Zbl. f. Bakteriol., 1952, t. 158, nr. 7–8, p. 454.
22. Lee H. F., *Use of the Chick Embryo for Preliminary in vivo Evaluation of Tuberculostatic Substances*, An. of New York Acad. of Sci., 1949, t. 52, nr. 5, p. 692.
23. Lee F. H. a. Stavitzky A. B., *Intravenous Infection of the Chick Embryo with Tubercle Bacilli (Inhibitory Effect of Streptomycin)*, Am. Rev. of Tub., 1947, t. 55, nr. 3, p. 262.
24. Lewi-Montalcini R. a. Hamburger V., *Selective Growth Stimulating Effects of Mouse Sarcome on the Sensory and Sympathetic Nervous System of the Chick Embryo*, J. Exp. Zool., 1951, t. 116, nr. 2, p. 321.
25. Menkes B., Cotăescu E., Deleanu M. și Oțetea G., *Cercetări asupra creșterii unor tumori maligne transplantate pe corpul sau pe membrana corion-alantoidiană a embrionului de găină și asupra reacției epiteliilor și mezenchimului embrionar în prezența acestor transplante*, Bul. științ. Acad. R.P.R., Secția de științe medicale, 1956, t. VIII, nr. 1, p. 307.
26. Moore M., *The Chorio-allantoic Membrane of Chick Embryos and its Response to Inoculation with some Mycobacteria*, J. Am. Pathol., 1942, t. 18, p. 827.
27. Needham I., *Chemical Embryology*, Cambridge, 1931, vol. III, p. 1454.
28. Pandit C. G., Sanjiva Rae a. Shortt H. E., *Response of the Chorio-allantoic Membrane of the Developing Chick Embryo to Inoculation with Various Substances, with Special Reference to B. proteus* X_{19}, Ind. J. Med. Res., 1938, nr. 25, p. 595.
29. Rist N., *Pathologie et thérapeutique expérimentales de la tuberculose*, Bibl. Tuberculosea, Schw. Ztschrift f. Tub., 1948, supl., p. 55.
30. Schürmann R., *Zur Histogenese des Tuberkels in der Chorio allantois Membran des Hühnchens*, Virch. Arch., 1952, t. 321, p. 325.
31. Tebiakina A. E., *Kurinnii embrion kak model dlia oțenki lecebnogo deistviia antibiotikov pri eksperimentelnoi holere*, J. mikrobiol., epidemiol. i immunol., 1955, nr. 7, p. 25.
32. Tokin B. P., *Immunitet zarodișei*, Izd. Leningr. Univ., 1955.
33. Tsun Tung, *Experimental Production and Chemoprophylaxis of Corynebacterium Diphteriae Infection in the Chick Embryo*, Am. J. of Hyg., 1945, t. 41, p. 57.
34. Weil A. J. a. Gall L. S., *Chemoterapeutic and Immunoterapeutic Testing of Eberthella Typhosa in the Developing Chick Embryos*, J. of Immunol., 1941, t. 41, p. 445.
35. Weil A. J. a. Volentine J. A., *Infection of the Developing Chick Embryo with Dysentery Bacilli*, Proc. Exp. Biol. Med., 1940, t. 44, p. 160.
36. Zalkind S. I., *Mitoticeskii rejim organizma v norme i patologhii*, Usp. sovrem. biol., 1954, t. 38, nr. 1, p. 68.

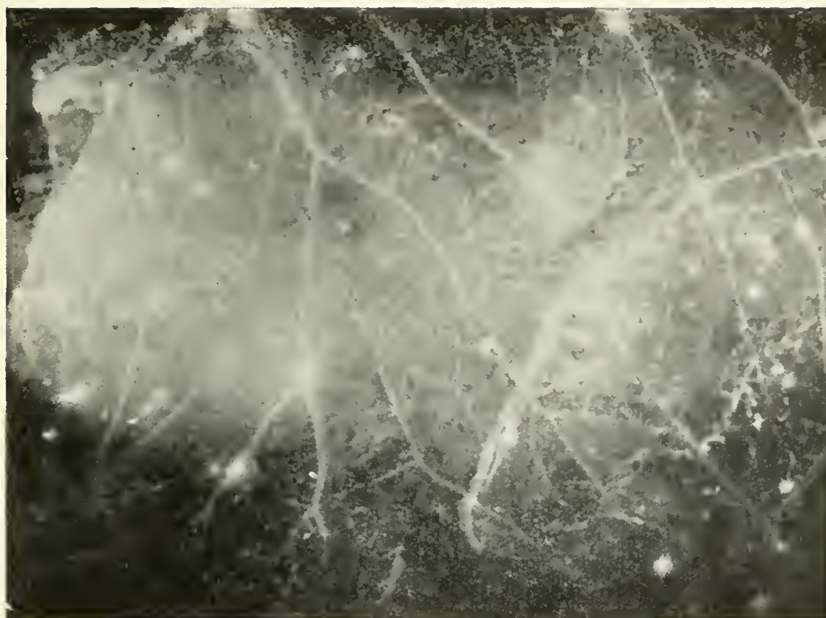


Fig. 194. — Tuberculi răzleţi, pe membrana corion-alantoidiană, la 9 zile după infecţia cu o suspensie de bacili Koch.

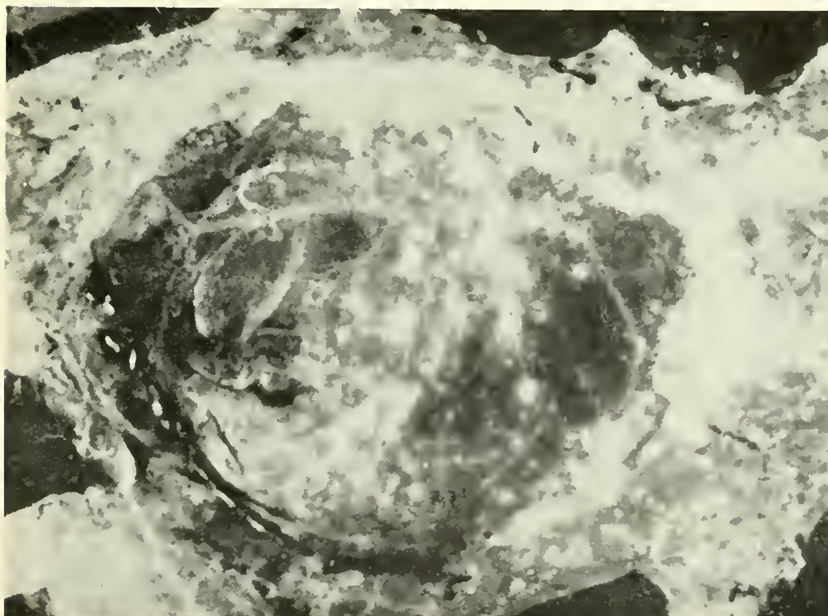


Fig. 195. — Puternică reacţie cu noduli confluenţi a membranei corion-alantoidiene. Infecţie prin implant de organ tuberculos. Recoltat la 10 zile după infecţie.

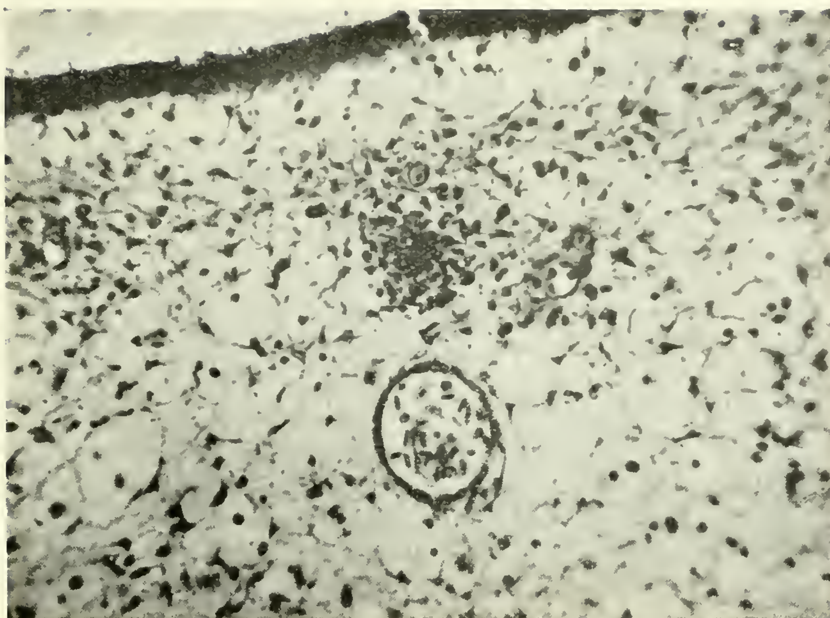


Fig. 196. — Membrană corion-alantoidiană. Infiltrat incipient la 10 zile după infecţie prin implant de organ tuberculos.

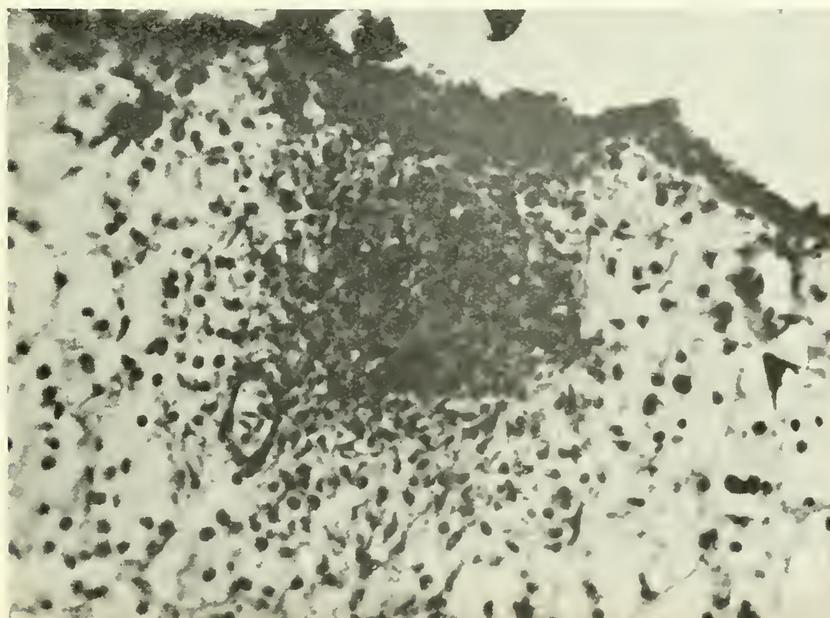


Fig. 197. — Membrana corion-alantoidiană. Nodul mai dezvoltat, la 10 zile după infecţie prin implant de organ tuberculos.



Fig. 198. — Nodul masiv cu zonă necrotică centrală pe membrana corion-alantoidiană, la 10 zile după infecţie prin implant de organ tuberculos.

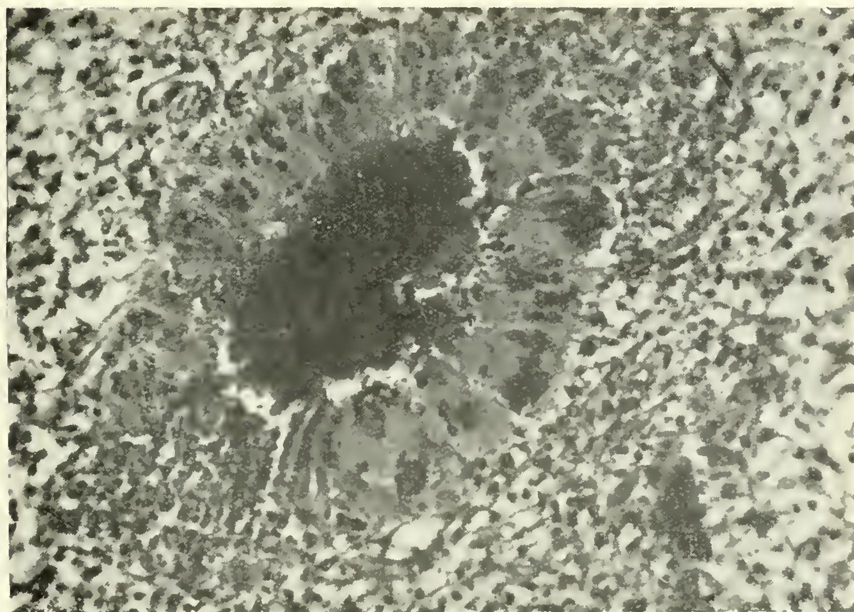


Fig. 199. — Membrana corion-alantoidiană la 10 zile după infecţie prin implant de organ tuberculos. Simplaşti aşezaţi radiar în jurul unei zone necrotice.

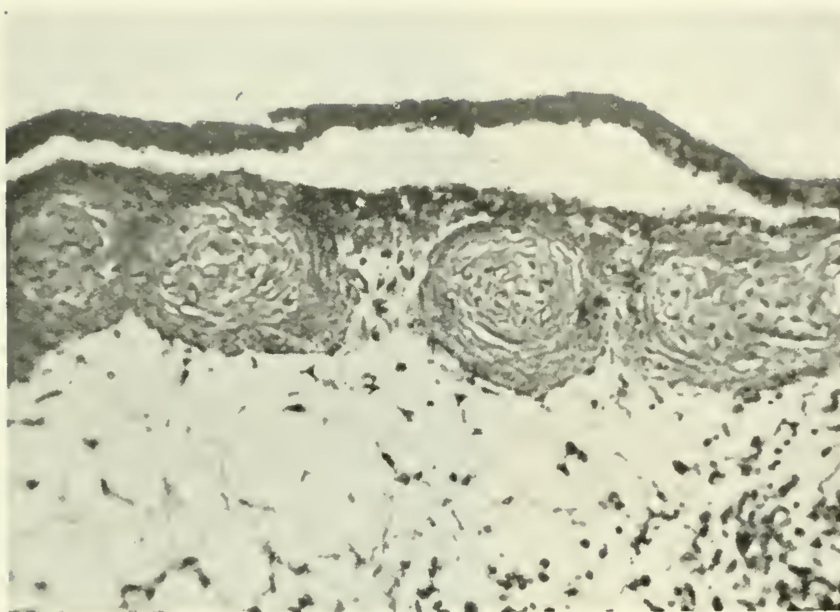


Fig. 200. — Metaplazia epiteliului corion-alantoidian sub formă de îngroşări şi perle epiteliale, parţial cornificate, la 11 zile după infecţie prin ţesut embrionar scăldat în suspensie bacilară.

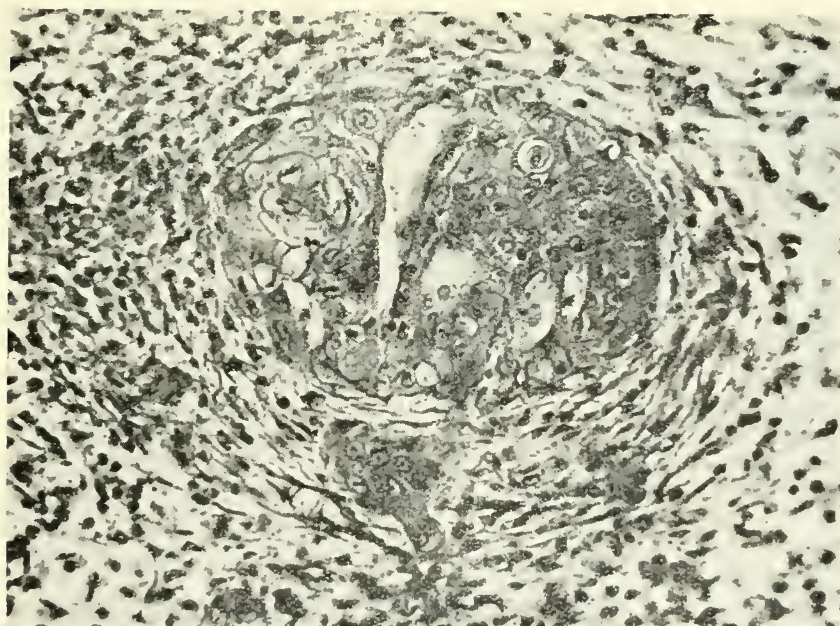


Fig. 201. — Insulă epitelială (rezultată din proliferarea epiteliului corion-alantoidian), la 10 zile după infecţie prin implant de organ tuberculos.



Fig. 202. — Embrion de găină de 15 zile de incubaţie. Nodul paramedian proeminind sub tegumentul regiunii dorsale, dezvoltat după infecţia corpului embrionar (implant de ţesut embrionar scăldat în suspensie de bacili Koch, introdus prin mieloschizis; 12 zile după infecţie).



Fig. 203. — Nodulul din figura 202 mărit.

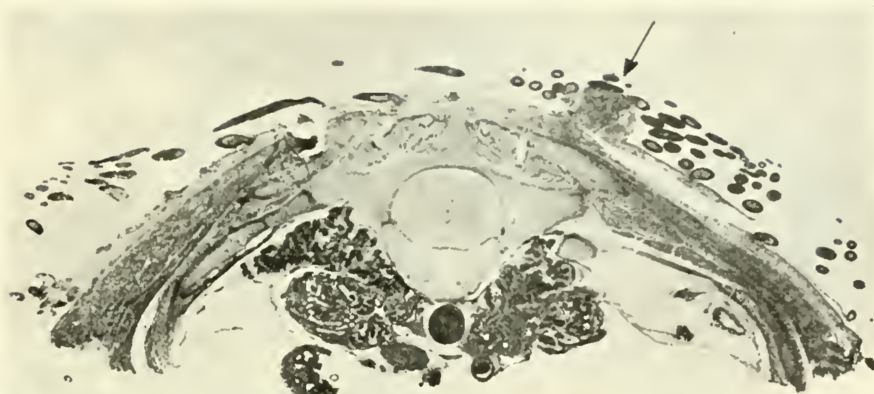


Fig. 204. — Secțiune transversală prin regiunea dorsală a unui embrion de găină de 14 zile de incubație. Nodul tuberculos tegumentar, la 11 zile după infecția corpului embrionar, prin implant de țesut scăldat în suspensie bacilară.



Fig. 205. — Secțiune transversală prin regiunea dorsală a embrionului de găină de 17 zile. Nodul tuberculos cu necroză centrală, obținut prin infecția directă a corpului embrionului.

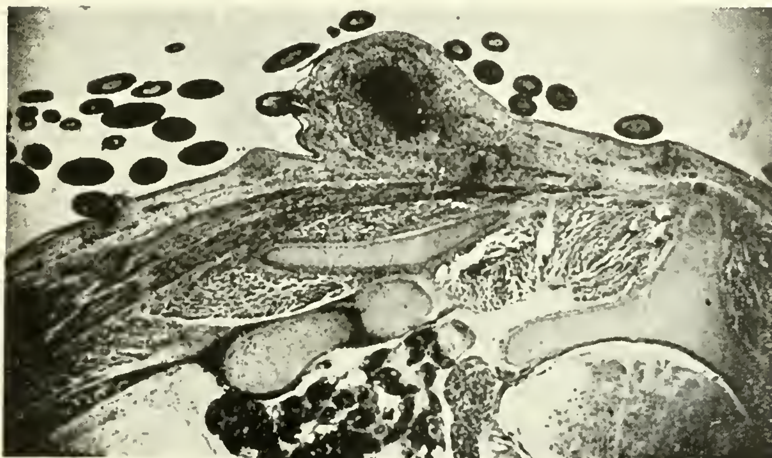


Fig. 206. — Nodulul din figura 205, mărit.

Fig. 207. — Nodul tuberculos cu cazeificare centrală. Infecția directă a corpului embrionar prin implant de organ scăldat în suspensie bacilară, la 10 zile după infecție.

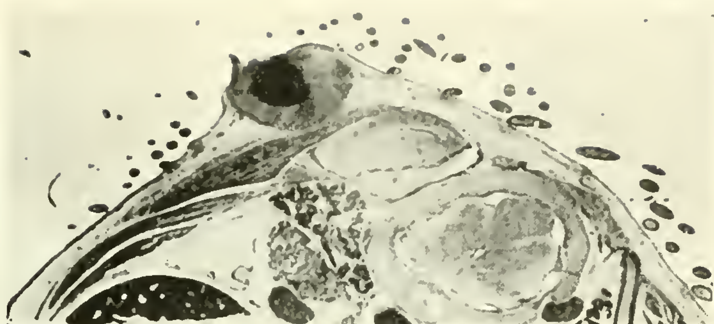




Fig. 208. — Infecția directă a corpului embrionar prin implant de țesut scăldat în suspensie bacilară, la 13 zile după infecție. Infiltrat inflamator specific în locul implantării și în canalul rahidian (meningită).

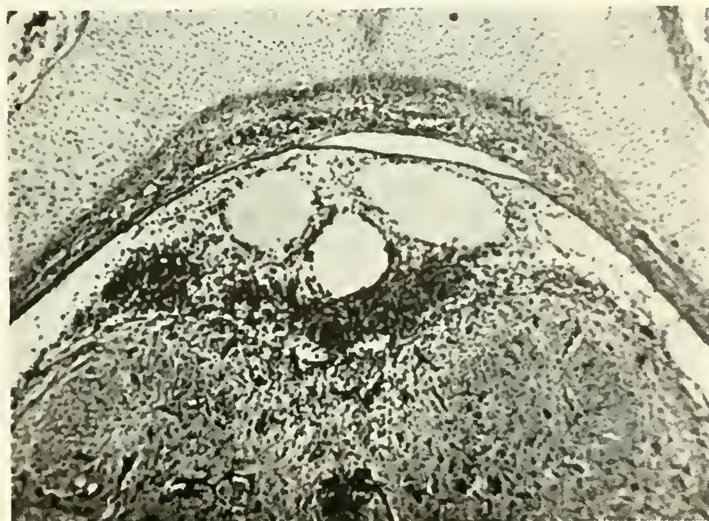


Fig. 209. — Infiltratul meningian din figura 208.

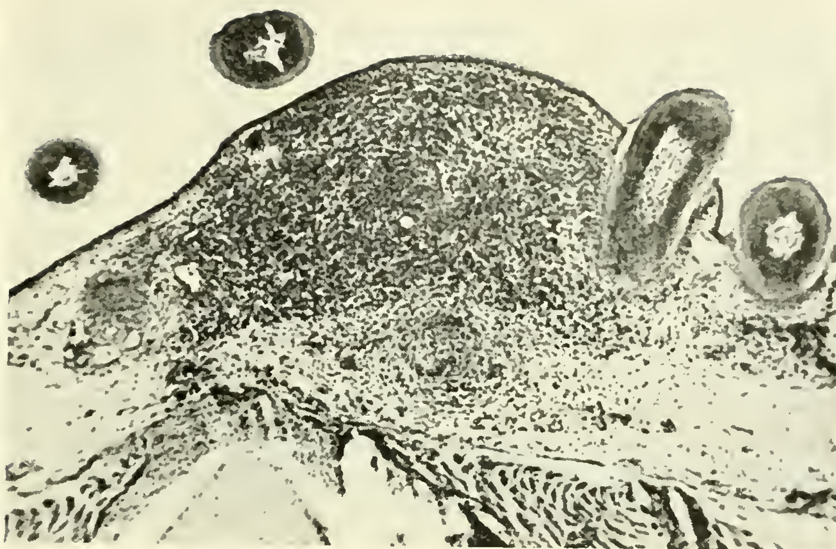


Fig. 210. — Nodul inflamator subcutan, acoperit de epteliu tegumentar. Se remarcă lipsa reacţiilor epiteliale şi dezvoltarea netulburată a papilelor penelor embrionare. Infecţie directă a corpului embrionar prin implant de ţesut scăldat în suspensie bacilară Aspect la 11 zile după infecţie.

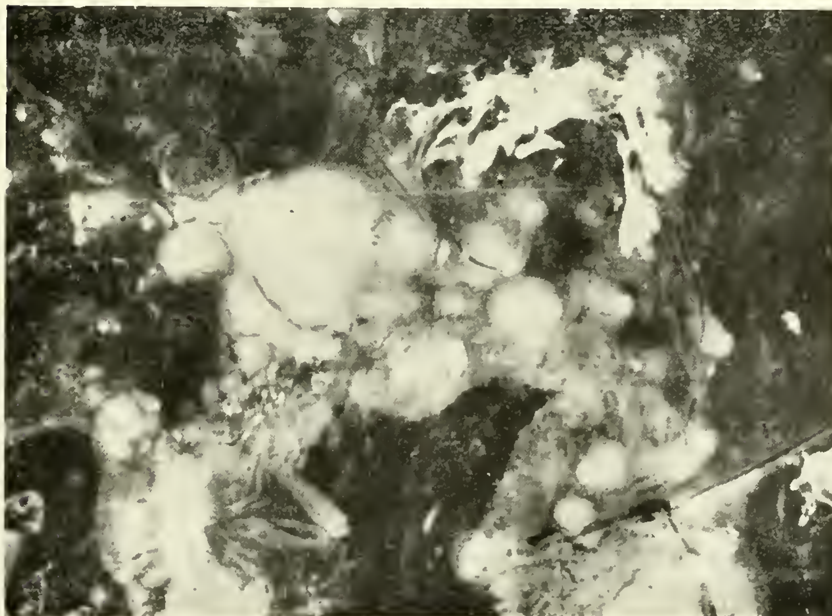


Fig. 211. — Noduli masivi în parte cazeificaţi, pe membrana corion-alantoidiană. Injecţia cu suspensie bacilară în sacul amniotic, Aspect la 15 zile după infecţie.

CERCETĂRI EXPERIMENTALE ASUPRA DEZVOLTĂRII ȘI REACTIVITĂȚII SISTEMULUI NERVOS LA EMBRIONUL DE GĂINĂ

Ontogeneza embrionară nu poate fi cercetată cu succes, considerînd părțile embrionului izolate unele de altele. Diferitele regiuni și părți constitutive ale corpului embrionar, aparținînd domeniilor macro-, micro- și submicroscopice, substanțele nutritive, anexele embrionului, organismele parentale și mediul acestora, toți acești componenți de bază în procesul dezvoltării embrionare, constituind complexul ontogenetic, respectiv embrionar, trebuie priviți în strînsă legătură și interacțiune de-a lungul diferitelor etape ale ontogenezei. Neglijarea studiului acestui complex constituie unul din neajunsurile așa-zisei „mecanici a dezvoltării".

Convingerea că totalitatea forțelor motrice, actuale și concrete ale procesului ontogenetic, își au sursa în acest complex ontogenetic — embrionar — istoric determinat, că ele izvorăsc din interacțiunile care au loc în sînul acestuia, constituie una din bazele concepției materialist-dialectice a ontogenezei.

Trebuie să admitem existența unor interrelații specifice fiecărui stadiu al ontogenezei, existente chiar în fazele cele mai precoce ale acesteia, interrelații care se confundă de fapt cu funcțiile părților constituente ale organismului embrionar în aceste perioade. Rolul pe care diferiții componenți ai organismului embrionar și ai întregului complex embrionar îl joacă în acest sistem interacțional se schimbă de la o treaptă de dezvoltare la cealaltă. Pe măsură ce se diferențiază țesuturile și organele, se modifică și interrelațiile lor.

Realizarea procesului ontogenetic, parcurgerea fiecărui stadiu, necesită, pentru fiecare parte a corpului embrionar, prezența unui anumit complex de condiții statornicite în decursul filogenezei.

Este clar că, pe baza acestei concepții, perioade „prefuncționale" nu sînt admisibile. Pînă la atingerea asemănării funcționale și morfologice cu organismul pe deplin dezvoltat („pragul fiziologic adult"), organele embrionare pot fi legate prin interrelații, deci pot avea funcții diferind cantitativ și calitativ de cele „adulte". Există însă o continuă evoluție a interrelațiilor dintre elementele constitutive ale embrionului, care se manifestă vizibil prin însuși progresul diferențierii morfo-funcționale.

Cunoașterea tuturor acestor interacțiuni „actuale" și a consecințelor lor, a istoriei lor filogenetice, ar fi echivalentă cu înțelegerea întregului proces de dezvoltare individuală.

Scopul cercetărilor pe care le expunem în acest capitol constă în căutarea locului pe care-l ocupă sistemul nervos embrionar în complexul de interacțiuni care stă la baza dezvoltării embrionare, rolul pe care sistemul nervos îl joacă de-a lungul dezvoltării treptelor succesive ontogenetice, și a influențelor pe care le suferă, la rîndul său, în acest timp.

În literatură există numeroase cercetări în acest domeniu, cu rezultate foarte contradictorii. Pe cînd unii autori merg pînă la negarea influenței sistemului nervos embrionar asupra procesului de diferențiere a celorlalte organe, alți autori, dimpotrivă, atribuie inervației embrionare un rol important în ontogeneză.

Dezvoltarea funcțiilor sistemului nervos, pe baza transmiterii la distanță a excitațiilor, este legată și de activitatea unor factori umorali, fie că este vorba de substanțe mediatoare, care apar la nivelul terminațiilor nervoase, fie că este vorba de acțiunea hormonilor, a căror secreție poate fi declanșată de excitații venite pe cale nervoasă. (Nervii pot să vehiculeze unele substanțe active).

Este probabil ca, înaintea diferențierii morfo-funcționale a transmiterii nervoase a excitațiilor la distanță în timpul ontogenezei, primordiile nervoase să acționeze și să fie influențate numai pe cale umorală, sau pe calea excitabilității generale a protoplasmei, din celulă în celulă.

Trebuie remarcat aici deosebitul merit al academicianului C. I. Parhon și al școlii sale, de a fi susținut încă de mult rolul pe care-l joacă glandele cu secreție internă în ontogeneza embrionară.

În cercetările pe care le-am întreprins ne-am servit de metoda extirpărilor, distrugerilor locale, redeschiderii tubului neural la nivelul măduvei sau rombencefalului, folosind intervențiile mecanice, termice și agenții radianți. O largă întrebuințare au găsit și metodele transplantării și explantării de organe embrionare în zone fără inervație, folosirea melanogenezei ca indicator al diferențierii neuro-umorale și utilizarea diferențelor iuțelii de diferențiere a sistemului neuro-endocrin la specii de păsări nidifuge și nidicole.

INTERVENȚII ASUPRA MĂDUVEI SPINĂRII REDESCHIDEREA TUBULUI NEURAL MEDULAR (MIELOSCHIZISUL EXPERIMENTAL)

Împreună cu C. Rîmniceanu am folosit această metodă pentru a studia modificările care apar în urma unei redeschideri a tubului neural, în structura și funcția măduvei, precum și efectul acestei intervenții asupra organelor periferice situate în teritoriul neuromerelor afectate.

Cu această ocazie am putut face o serie de observații în legătură cu dezvoltarea normală a organelor axiale (măduva, coloana vertebrală, musculatura dorsală etc.) și în legătură cu malformații frecvente, congenitale, ale acestor organe (spina bifidă etc.). Cu toate că unele din aceste observații sînt numai indirect legate de problema reactivității, le vom descrie tot în acest capitol.

În afară de aceasta, mielorahischizisul experimental a devenit în laboratorul nostru o fază (timp) de pregătire pentru executarea electrocauterizării sau electrolizei măduvei, și pentru tehnica transplantării de organe pe corpul embrionului.

Exteriorizarea tubului neural deschis pe lungimi diferite (chiar considerabile) permite, de altfel, și observația vitală a suprafeței ependimare, a dezvoltării circulației sanguine intramedulare și a altor fenomene de care ne vom ocupa mai tîrziu. Din motive expuse anterior, întreprindem această operație în ziua a treia de incubație, după ce am ferestruit oul în a doua zi de incubație. Operația constă în incizarea tegumentului și a suturii dorsale a tubului neural, la nivelul mugurilor membrelor inferioare, al membrelor superioare sau între regiunile membrelor. În zilele care urmează operației putem observa, prin fereastra oului, dezvoltarea regiunii afectate.

Tubul neural deschis se poate observa și prin transparența amniosului (care s-a închis între timp). Tensiunea transversală, acționînd asupra tubului neural deschis, face ca cele două buze ale jgheabului neural format din nou să se îndepărteze din ce în ce mai mult de linia mediană (fig. 212), jgheabul neural deschizîndu-se ca o carte pînă la întinderea lui completă pe suprafața dorsală a embrionului. Se formează o placă neurală ale cărei margini laterale restabilesc continuitatea cu ectodermul tegumentar. Observînd cu lupa binoculară sau cu ultropacul suprafața acestei plăci neurale prin transparența amniosului

(sau după suprimarea completă a amniosului), putem urmări dezvoltarea vascularizației tubului neural, transformarea lui într-un organ. Vasele se dezvoltă în măduvă segmental, metameric. Depunînd coloranți vitali (roșu neutru etc.) pe alantoidă, unde aceștia sînt resorbiți, putem observa difuziunea lor din vasele medulare în substanța nervoasă.

În unele cazuri, placa nervoasă denudată prezintă fenomene regresive, se detașează de suportul ei și se necrozează. În felul acesta se realizează o adevărată extirpare lentă a măduvei de-a lungul unui număr mai mare sau mai mic de metamere.

Am putut urmări astfel pînă la ecloziune unii embrioni operați. Din 100 de embrioni operați, eclozează de obicei unul sau doi. Mortalitatea este mai mare între a șasea și a noua zi și spre a 19-a zi de incubație (fig. 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220 și 221).

În nici unul din cazurile operate nu am putut observa vreodată malformații (existente de obicei în cazurile cu malformație spontană a măduvei) ale membrelor inferioare sau superioare, dacă operația s-a executat la nivelul acestora. Dacă deschiderea artificială a tubului neural nu a depășit circa cinci segmente, se poate observa o reînchidere spontană a jgheabului neural în a doua jumătate a incubației. Persistă uneori fine traiecte fistuloase care se deschid în afară; în unele cazuri, însă, tegumentul se închide complet deasupra regiunii afectate. Aceasta demonstrează posibilitățile de vindecare de care dispune și organismul embrionar.

Comportarea unui pui eclozat, căruia i s-a deschis măduva la nivelul membrelor inferioare, ni se pare demnă de a fi remarcată. Imediat după ecloziune, acest pui a putut să se mențină în picioare și a umblat. Abia după 2—3 zile de viață posteclozională s-au instalat o paraplegie și o atrofie progresivă a musculaturii membrelor inferioare.

Se pare că, în cazul acesta, abia solicitarea normală a membrelor inferioare, legată de viață posteclozională, a evidențiat funcțional deficiența aparatului medular, care pînă atunci a rămas fără influență asupra diferențierii morfologice și asupra troficității (și chiar asupra funcției motorii) a membrelor inferioare.

Înainte de a trece la descrierea și analiza modificărilor formei și structurei măduvei și a relațiilor topografice cu celelalte organe embrionare în urma intervenției de mieloschizis vom face o sumară descriere a aspectului normal al regiunii în care intervenim, așa cum se prezintă la embrionul de trei zile de incubație (fig. 222 și 223).

O secțiune transversală prin trunchiul embrionului la nivelul mugurilor membrelor inferioare în a treia zi de incubație ne arată (fig. 223) tubul neural, ca o formațiune ovală prezentînd la mijlocul lui canalul ependimar; întregul canal ependimar împreună cu vezicule cerebrale formează la această epocă o cavitate continuă, injectabilă în totalitatea ei din oricare parte a tubului neural. Diferențierea histologică — încă foarte slabă — începe să se manifeste pe preparate impregnate argentic prin apariția unei granițe între mantaua periferică și zona centrală, și prin apariția fasciculelor posterioare și anterioare, a comisurii posterioare și anterioare, a coarnelor anterioare. Pe preparate obținute cu ajutorul impregnației argentice distingem rădăcinile posterioare în continuitate pe de o parte cu cordoanele posterioare abia schițate, pe de altă parte cu ganglionul rahidian (creasta ganglionară detașată). Rădăcinile anterioare, ale căror fibre pornesc din pericarionii viitoarelor coarne anterioare, formează, în mod tipic, împreună cu prelungirile periferice ale celulelor ganglionare, încă bipolare, din ganglionul rahidian, nervul rahidian care se divide imediat în ramura sa posterioară și ramura sa anterioară.

Ganglionii rahidieni se găsesc în dreapta și în stînga tubului neural, în imediata lui vecinătate și mai apropiați de partea sa dorsală (posterioară).

Imediat ventral față de tubul neural găsim coarda dorsală încă înaintea transformării ei veziculoase; în primele trei zile de incubație coarda dorsală este formată, după cum se știe, dintr-un cordon celular de structura epitelială obișnuită. Abia spre sfîrșitul celei de a treia zile de incubație începe tumefacția hidropică a celulelor notocordului. Această imbibiție merge paralel cu acumularea lichidului amniotic și cu creșterea rapidă a cantității lichidului subembrionar. Cantitatea de apă necesară acestor procese provine, cum se va vedea într-un alt capitol, din albuș. De jur împrejurul coardei dorsale, mezenchimul începe să se condenseze, contrastînd cu aspectul reticulat lax al zonelor mezenchimatoase mai îndepărtate. Subliniem că în mod normal suprafața anterioară (ventrală) a tubului neural se găsește în contact direct cu această parte condensată pericordală (cu sclerotomul). În dreapta și în stînga formațiunilor nervoase găsim somitele, care în a treia zi de incubație nu ajung încă pînă la nivelul crestelor ganglionare, respectiv ganglionilor rahidieni, muchia lor dorsală aflîndu-se pe un plan ceva mai ventral. Lateral de șirul somitelor se află, de ambele părți, plăcile laterale ale trunchiului și primordiile membrelor sub formă de aripioare mezenchimatoase încă nediferențiate, însă foarte bogat vascularizate. Nu insistăm aici asupra celorlalte formațiuni : aorta, canalicule segmentare și canalul lui Wolff, endodermul etc.

La suprafața corpului embrionar se află ectodermul tegumentar format dintr-un singur strat de celule cubice, despărțit de tubul neural și somită de un ingust strat de mezenchim lax.

Redeschiderea tubului neural produce însemnate modificări în topografia și forma organelor axiale învecinate și în însăși structura măduvei. Prin retransformarea tubului neural într-o placă neurală care se întinde pe suprafața dorsală a embrionului, epiteliul ependimar devine o parte integrantă a suprafeței corpului embrionar și restabilește lateral legătura pierdută în timpul formării tubului neural cu ectodermul tegumentar. Celulele ectodermului tegumentar se continuă acum direct cu celulele care intră în constituția plăcii neurale.

Întreaga regiune dorsală a embrionului poartă pecetea deschiderii sub forma de carte a tubului neural.

Examinată în zilele următoare operației, toate formațiunile dorsale, situate în mod normal lateral față de tubul neural, au fost împinse în direcția ventrală. În ceea ce privește formațiunile care în mod normal ar trebui să înconjure tubul neural, acestea au fost, bineînțeles, împiedicate să se formeze (fig. 218 și 219).

Rădăcinile anterioare și posterioare emerg acum de pe fața ventrală a plăcii neurale. Ganglionii rahidieni, în loc să se afle lateral, față de tubul neural, sînt găsiți acum dedesubtul plăcii neurale..

Prin întinderea celor două jumătăți ale tubului neural pe suprafața dorsală a embrionului, porțiunea mediană (comisurală) — de legătură — între cele două jumtăți s-a îndepărtat de sclerotomul care înconjură coarda dorsală. Prin această îndepărtare a plăcii neurale de sclerotom ia naștere un aspect foarte caracteristic, pe care îl găsim numai în regiunea mieloschizisului, și anume : prezența unei benzi mezenchimatoase largi, formată dintr-o rețea laxă de celule, între care se găsesc capilare. Această bandă mezenchimatoasă anormală. care se găsește între tubul neural și sclerotom în toate cazurile operate, este traversată, în porțiunile ei laterale, de nervii rahidieni (fig. 221).

Muchiile dorsale ale somitelor, în întregime împinse în direcția ventrală, sînt și răsfrînte în afară.

Modificările descrise, care s-au instalat în urma schimbării formei tubului neural, ne permit să tragem unele concluzii asupra rolului pe care îl are forma exterioară a organelor embrionare în procesul de diferenţiere a organelor învecinate şi întrucît forma proprie depinde de condiţiile ambianţei, adică este condiţonată de cea a organelor învecinate.

Noi constatăm, într-adevăr, că forma corpului şi a arcului vertebral, a ganglionilor rahidieni, dispoziţia musculaturii dorsale etc. depind la embrion — în decursul dezvoltării — foarte mult de integritatea morfologică şi forma normală a tubului neural. Vom reveni în alt capitol asupra influenţei formelor globale ale organelor şi a factorilor mecanici legaţi de acestea în morfogeneză.

Fowler şi Watterson au descris în 1953—1954, deci cinci ani după noi, aceleaşi modificări.

În epiteliul ependimar putem constata o scădere a numărului mitozelor ventriculare. Ependimul vine acum în contact direct, nu cu lichidul ependimar, ci cu lichidul amniotic. Considerînd ansamblul modificărilor, aşa cum apar la două sau trei zile după intervenţie, ne dăm seama că am creat aspecte foarte asemănătoare cu o malformaţie spontană frecventă : spina bifidă.

Prezentăm un caz de spină bifidă spontană la embrionul de găină, cu care putem compara rezultatele obţinute prin operaţia noastră (fig. 224). Ca ansamblu şi ca structură microscopică trebuie relevată identitatea aspectului plăcii neurale şi a topografiei organelor învecinate cu cazurile experimentale. La embrionul cu mieloschizis spontan, coexistă însă şi alte malformaţii, şi anume : malformaţia membrelor inferioare şi a măduvei spinării în porţiunea situată caudal faţă de mieloschizis. La membrele inferioare ne izbeşte îndreptarea lor de-a lungul axului longitudinal al embrionului, în loc să facă cu aceasta un unghi de circa 90°. În afară de aceasta există o simpodie, membrele inferioare fiind unite printr-o punte de ţesut mezenchimatos.

Trebuie să reamintim aici frecvenţa malformaţiilor membrelor inferioare care însoţesc de obicei diferitele forme de mieloschizis spontan la toate vertebratele, inclusiv omul (fig. 227).

Dedesubtul nivelului mieloschizisului spontan, măduva reprezintă o dedublare netă a canalului ependimar, aproape o dedublare a măduvei întregi (fig. 224). Este important că banda mezenchimatoasă, descrisă în cazurile experimentale, există şi în cazul spontan. În regiunea mieloschizisului se observă un cordon nervos anormal care porneşte din regiunea mediană a plăcii neurale şi traversează puntea mezenchimatoasă existentă în cazurile experimentale fiind situată tipic între placa neurală şi vertebră în ţinutul malformaţiei. Trunchiul nervos se îndreaptă spre circumferinţa posterioară a corpului vertebral, care prezintă un fel de jgheab pentru primirea acestui trunchi nervos anormal (fig. 225).

Vedem deci că operaţia noastră, executată pe embrioni normali, a dat naştere — în cursul procesului de dezvoltare care continuă după intervenţie — unei conformaţii a organelor embrionare care seamănă mult cu malformaţia spontană sau provocată experimental prin metode indirecte (vezi : metode indirecte pentru provocarea spinei bifide).

Spre deosebire însă de ceea ce se observă în cazurile spontane sau obţinute prin metode indirecte, aici nu se constată niciodată anomaliile altor organe care însoţesc de obicei spina bifidă spontană.

Sîntem îndreptăţiţi să distingem în cadrul malformaţiilor spontane două grupe de modificări : primare, efectul propriu-zis al cauzelor teratogene, şi secundare, rezultînd din tulburarea evoluţiei normale a procesului de dezvoltare, consecutivă modificărilor

primare. Aceste tulburări secundare nu sînt decît consecințele acțiunii teratogene inițiale. În cazul nostru experimental, deschiderea tubului neural constituie modificarea primară, iar aceasta este urmată de modificările descrise ale ganglionilor rahidieni, musculaturii dorsale, arcului și corpului vertebrelor etc., modificări care intră în categoria celor secundare.

Necesitatea acestei distincțiuni între modificările primare și secundare, care, în cazul nostru, devine posibilă grație tehnicii noastre experimentale, se va impune și mai mult cu ocazia discuției intervențiilor asupra rombencefalului.

În cazul malformațiilor spontane acționează simultan factori teratogeni (izvorîți din condiții anormale de interacțiune în sînul complexului embrionar) asupra întregului embrion, iar unele regiuni deosebit de sensibile, în momentul acțiunii maxime a acestor agenți, devin anormale.

Literatura, îndeosebi cea veche, în legătură cu mielorahischizisul experimental și spontan, este foarte bogată.

Realizarea experimentală a mieloschizisului a reușit cu mijloacele indirecte cele mai diverse: încălziri anormale (Kollmann, Hertwig, Gurwitsch), răciri, lacări ale ouălor (Mitrofanov), zguduiri ale oului, introduceri de diferite substanțe în ou, ca: apă distilată, clorură de sodiu, roșu Scharlach (Köstner, Schulze, Hertwig, Simkevici, Ancel). E. Wolff a obținut spina bifidă prin iradieri cu raze röntgen.

Metode directe au fost folosite pentru prima dată cu succes de Luksch, care a înțepat blastodermul embrionului de rață la nivelul canalului neurenteric, obținînd în felul acesta spina bifidă.

Cauzele primare ale spinei bifide spontane nu sînt nici astăzi cunoscute. O expunere completă a literaturii mai vechi, care, de fapt, nu este încă depășită de lucrările mai recente, se găsește în cunoscutul tratat „Die Pathologie der Missbildungen des Menschen und der Tiere", sub redacția lui E. Schwalbe, în capitolul scris de P. Ernst, 1909.

Ancel a obținut, după cum s-a amintit mai sus, prin metode chimice, spina bifidă la embrionul de găină (1946 – 1947). Prin acțiunea sulfatului de ezerină, metilarseniatului de sodiu, colhicinei etc. asupra oului, în prima zi de incubație, el a obținut în 33% din cazuri spina bifidă, pe lîngă alte malformații. Chiar și simpla ferestruire a oului, la 26 de ore de incubație, urmată de depunerea unei picături de apă distilată pe embrion, poate să provoace — printre alte malformații — și spina bifidă (mieloschizisul). Aspectele macro- și microscopice ale malformației pe care o obține Ancel sînt identice cu cele realizate de noi printr-o metodă chirurgicală directă. Ancel descrie și banda de țesut mezenchimatos, care în regiunea afectată separă placa nervoasă de coarda dorsală. El se întreabă dacă această bandă n-ar prezenta un raport cauzal cu însăși malformația tubului neural. Ancel ajunge la concluzia că „primordiul inițial sensibil la agenții teratogeni producători de spină bifidă ar fi cel al mezoblastului somitic și că acțiunea agenților teratogeni are ca efect împiedicarea diviziunii în două mase laterale ale mezoblastului somitic situat sub tubul neural".

Reiese clar că Ancel consideră mezenchimul situat între coarda dorsală și tubul neural afectat de mieloschizis ca unul dintre factorii esențiali în lanțul cauzal care duce pînă la malformația tubului neural. Autorul leagă această idee de concepțiile școlii spemaniene privind influența inductoare a cordomezoblastului asupra diferențierii tubului neural.

Nu putem accepta această ipoteză a lui A n e e l, căci rezultatele experiențelor noastre directe arată, în mod indubitabil, că formarea benzii mezenchimatoase este o consecință a intervenției asupra tubului neural, intrînd deci în categoria modificărilor secundare.

Cititorul va fi poate surprins de a găsi aceste considerații teratologice într-un capitol consacrat studiului proceselor de dezvoltare a reactivității sistemului nervos central. În legătură cu aceasta trebuie să amintim că, în perioade precoce ale dezvoltării, primordiile sistemului nervos central reacționează și acționează la rîndul lor asupra celorlalți componenți ai complexului embrionar în mod cu totul diferit decît după depășirea pragului funcțional adult.

Perioada de „determinare teratogenetică" (S c h w a l b e), deci perioada acțiunii eficace a complexului de factori teratogeni, plasîndu-se în primele faze ale ontogenezei embrionare (pentru malformațiile care ne interesează aici), analiza experimentală a acestora reprezintă una din căile de studiu al funcțiilor și al reactivității „preadulte" a sistemului nervos la care predomină efectul morfogenetic. Funcțiile specifice ale sistemului nervos apar și se dezvoltă pe fondul funcțiilor morfogenetice (preadulte), în strînsă legătură cu ele.

Noi privim morfogeneza și diferențierea funcțiilor normale și ca o expresie a reactivității primordiilor embrionare.

Studiul malformațiilor în general și al celor ale sistemului nervos în special poate fi deci considerat ca o metodă valabilă în cercetarea reactivității primordiilor embrionare, specifice acestor stadii timpurii. În consecință, găsim justificată înserarea cercetărilor descrise în acest capitol.

Noi datorăm de altfel teratologiei cunoașterea unor părți însemnate ale ontogenezei sistemului nervos. Pentru a nu depăși cadrul cercetărilor de care ne ocupăm aici, vom reaminti numai că tocmai examinarea atentă a unor cazuri de amielie și anencefalie a permis lui M o n a k o v și L e o n o v a (1892) să aducă o contribuție esențială la cunoașterea morfogenezei măduvei spinării. M o n a k o v a observat că în unele cazuri de amielie totală pot persista ganglionii rahidieni, iar în rudimentul canalului medular se găsesc fascicule de rădăcini posterioare, îndreptîndu-se cranial înspre orificiul occipital. Ganglionii simpatici prezintă de asemenea o localizare și o structură normală. Aceste date morfologice au întărit la acea epocă concepția (justă) că pericarionii protoneuronilor senzitivi își au sediul în ganglionul spinal și nu în măduvă, și că neuroblaștii ganglionilor spinali și ganglionilor simpatici emigrează din tubul neural încă înaintea instalării malformației.

Asocierea frecventă dintre mielorahischizis și craniorahischizis, dintre amielie și anencefalie, arată unitatea acestor malformații, susținută de M o r g a g n i. Prezentăm aici un caz de craniorahischizis cu amielie și anencefalie și un caz de spina bifidă, amîndouă la om (fig. 226, 227 și 228).

CERCETĂRI EXPERIMENTALE ASUPRA DEZVOLTĂRII FUNCȚIILOR MĂDUVEI EMBRIONARE ȘI A POSIBILITĂȚILOR EI DE REGENERARE ȘI COMPENSARE DUPĂ DISTRUGERI LOCALIZATE

În cercetările a căror descriere urmează, trecem la studiul efectelor distrugerilor parțiale ale măduvei embrionului, adică la studiul consecințelor reducerii participării măduvei la complexul de interacțiuni din sînul organismului embrionar.

În aceste cercetări, efectuate împreună cu C. R î m n i c e a n u și C. M i c l e a, am urmărit consecințele distrugerilor localizate ale măduvei asupra organelor inervate de segmentul afectat și posibilitățile de compensare de care dispune organismul embrionar în urma creării unor asemenea defecte. În sfîrșit, am urmărit posibilitățile de regenerare pe care le interpretăm ca expresie a reactivității „de interacțiune" a întregului complex embrionar, în general, și a sistemului nervos în special, la această treaptă de dezvoltare.

I. P. P a v l o v și colaboratorii lui au dat o largă folosire tehnicilor de extirpare în scopul de a analiza funcțional sistemul nervos central al animalelor adulte și mai ales al animalelor în timpul primelor faze ale ontogenezei postembrionare. Prin această metodă s-au putut cerceta — printre altele — și „rezervele funcționale" ale sistemului nervos central, rămase de exemplu după distrugerea parțială sau totală a nucleului central al unui analizor. Adaptarea și reorganizarea treptată a resturilor analizorului și limitele acestui proces de compensare au putut fi astfel studiate prin aplicarea tehnicilor de extirpare.

Activitatea compensatoare care se dezvoltă treptat în părțile periferice și centrale ale analizorului cortical, mobilizarea „rezervelor" — cum spunea I. P. P a v l o v — se dezvoltă la animalele adulte paralel cu efectele cicatrizării leziunii experimentale. În principiu se poate obține o restabilire funcțională completă sau parțială, deci compensarea defectului. Metodica studiului posibilităților de compensare ale sistemului nervos central în timpul ontogenezei embrionare se reduce în fazele precoce de dezvoltare la cercetări morfologice și morfogenetice asupra sistemului nervos lezat experimental și a răsunetului asupra celorlalte organe și țesuturi embrionare, urmărind posibilitățile de regenerare și de supleare morfologice ale porțiunilor distruse sau studiul activității enzimatice și biochimice a sistemului nervos central și a celorlalte organe ale embrionului. Numai într-o fază mai înaintată a procesului ontogenetic, cînd apar mișcări reflexe, acestea pot servi drept criteriu pentru dezvoltarea normală sau anormală a funcțiilor sistemului nervos embrionar.

Înaintea perioadei de instalare a mișcărilor reflexe ale embrionului (vezi amănunțitele lucrări ale lui V o l o h o v), cercetarea posibilităților de compensare (de acomodare) ale sistemului nervos central și periferic, deci cercetarea dezvoltării unor funcții esențiale ale sistemului nervos, este limitată la studiul proceselor de regenerare din sînul sistemului nervos și al proceselor de diferențiere biochimică și enzimatică a sistemului nervos și a organelor și țesuturilor inervate; această diferențiere oglindește — într-o anumită măsură și în mod diferit pentru fiecare stadiu de dezvoltare embrionară și pentru fiecare organ — interacțiunea dintre sistemul nervos și organul inervat.

Evidențierea și cercetarea activității diferitelor enzime, repartizarea lor în sistemul nervos central și în organele periferice înainte și după microintervențiile efectuate asupra tubului neural embrionar, pot servi, împreună cu alte metode biochimice și biofizice, ca un indicator al proceselor intime care au loc în cursul proceselor de compensare.

Pentru studiul dinamicii interacțiunilor dintre sistemul nervos central și restul corpului embrionar și al raporturilor embrionului întreg cu ambianța sa imediată sau îndepărtată s-au dezvoltat diferite metode experimentale, directe sau indirecte.

Metodele indirecte pun întregul embrion sub influența unui agent chimic, fizic sau biologic (de ex. hormoni, ergone etc.), iar gradul de diferențiere și reactivitate a anumitor părți ale embrionului se manifestă printr-un răspuns, putînd demonstra existența unei electivități deosebite față de agentul întrebuințat. Metodele directe acționează de la început asupra anumitor porțiuni delimitate ale embrionului.

Pentru studierea sistemului nervos central s-au folosit în cadrul metodelor indirecte şi unele substanţe toxice, care la animalul adult posedă o electivitate netă pentru sistemul nervos central. Astfel s-au folosit vapori de eter sau cloroform, barbiturice, cloralhidrat, substanţe care se răspîndesc, după introducerea lor în ou, în întregul corp embrionar şi în anexele acestuia. Se urmăreşte începutul acţiunilor acestor substanţe asupra sistemului nervos central prin apariţia unor modificări morfologice, funcţionale sau biochimice, net sezisabile în cursul dezvoltării ontogenetice.

Colectivul nostru studiază dezvoltarea acestei metode, îndeosebi urmărirea efectului cloralhidratului, luminalului, eterului şi cloroformului, al deconectantelor etc., pentru a analiza diferenţierea ontogenetică funcţională a sistemului nervos central la embrion.

În cursul cercetărilor noastre, care urmăresc studiul dinamicii interacţiunilor dintre sistemul nervos şi celelalte organe în timpul ontogenezei embrionare, am fost nevoiţi să ne folosim (pe lîngă altele) şi de tehnici de extirpare parţială a tubului neural (măduvă) a veziculelor cerebrale şi a veziculei optice.

Distrugerea parţială a măduvei fără lezarea simultană a somitelor necesită o tehnică specială, la dezvoltarea căreia laboratorul nostru a adus o contribuţie. După cum rezultă din schema din figura 229, extremităţile dorsale ale somitelor şi linia de sudură dorsală a tubului neural se află pe planuri apropiate. Pe de altă parte, ganglionii rahidieni se găsesc în imediata vecinătate a suprafeţelor laterale ale tubului neural. Această situaţie topografică face dificilă atingerea, prin mijloace mecanice, termice, electrotermice etc., numai a tubului neural, lăsînd intacte somitele şi ganglionii rahidieni.

Pentru a putea efectua prin electrocauterizare distrugeri strict localizate numai la tubul neural, noi instituim în prealabil în a treia zi de incubaţie, prin deschiderea tubului în regiunea în care vrem să intervenim, un *mieloschizis*. Larga întindere transversală a tubului neural deschis, împingerea laterală a somitelor facilitează mult intervenţia propriu-zisă, care urmează. Electrocauterizarea se poate face imediat după instituirea mieloschizisului sau mai bine la 24 de ore după aceea, cînd deplasările somitelor şi ganglionilor rahidieni, descrise mai înainte, au devenit mai accentuate.

În felul acesta atacăm cu instrumentul cauterizant tubul neural în partea sa ependimară, evitînd astfel lezarea celorlalte porţiuni, in mod normal adiacente. Cu această tehnică reuşim să distrugem tubul neural al embrionului de găină de 3—4 zile pe o distanţă de 10—15 segmente, fie la nivelul membrelor inferioare, fie la nivelul membrelor superioare.

Hemidistrugerea măduvei reuşeşte de asemenea cu această tehnică.

După golirea spaţiului în care se află în mod normal tubul neural, prin aspirarea —cu micropipeta—a resturilor coagulate, care eventual ar pluti încă în cîmpul operator, embrionul este lăsat să-şi continue dezvoltarea în termostat.

Intervenţia se poate executa cu mîna liberă, dar pentru mai multă exactitate microcauterul şi depărtătoarele se pot monta pe braţele unui micromanipulator.

Distrugeri parţiale ale măduvei embrionare şi ale veziculelor cerebrale au fost executate de un mare număr de experimentatori, în diferite scopuri. Cităm dintre cei mai recenţi pe R. Levi-Montalcini, V. Hamburger, E. v. Campenhout, E. L. Wenger-Lerner, G. Nawar, W. S. Hammond, G. Strudel şi alţii.

Problema urmărită în majoritatea cazurilor a fost originea simpatoblaştilor şi rolul nervilor cranieni (îndeosebi a vagului) asupra diferitelor procese de diferenţiere.

Cum se vede în figura 240, se poate obține o vindecare completă a rănii tegumentare și o umplere de către țesutul mezenchimatos a golului rezultat prin distrugerea tubului neural. Distrugerea măduvei se poate obține cu sau fără persistența ganglionilor rahidieni.

Redăm în detaliu observațiile și rezultatele experiențelor noastre efectuate în a treia zi de incubație și urmărite pînă în a 15-a zi de incubație.

În primele zile după intervenție, la nivelul leziunii operatoare apare o curbă lordotică a organelor axiale și, în același timp, o scurtare a trunchiului, care are ca rezultat apropierea membrelor superioare de cele inferioare (fig. 230). În felul acesta, capetele măduvei care delimitează defectul sînt apropiate în mod mecanic, reducîndu-se întinderea cîmpului operator. Lordoza dispare în cursul dezvoltării ulterioare.

Mai tîrziu, tegumentul, incizat deasupra leziunii medulare, se închide. În cazurile de refacere completă a tegumentului, aspectul exterior al embrionului nu trădează importantele defecte medulare existente.

Dezvoltarea membrelor la nivelul cărora măduva a fost distrusă nu a arătat, spre surprinderea noastră, nici o modificare morfo-funcțională în primele 12 zile ale incubației. Fenomenul acesta s-ar putea explica și prin regenerarea nervilor, cum vom arăta mai tîrziu. Mugurii membrelor, existenți în momentul intervenției, se diferențiază și prezintă mișcările tipice pentru această perioadă de dezvoltare.

Numai în cîteva cazuri, pe care le vom descrie în amănunt, s-au obținut importante malformații ale membrelor, iar în alte cazuri, defecte ale peretelui trunchiului sau musculaturii dorsale.

Abia după 12 zile (la 15—16 zile de incubație) s-au putut observa efectele leziunilor medulare la nivelul membrelor. Membrele inferioare ale embrionilor operați capătă o poziție anormală, cu degetele în „gheară" și pierd mișcările caracteristice acestei perioade de dezvoltare, în contrast cu mișcările vii ale martorilor (fig. 231 și 232).

Examenul histologic al embrionilor operați a arătat următoarele :

1. După hemidistrugeri medulare nu s-au obținut epitelizarea și închiderea tegumentului deasupra măduvei lezate.

De asemenea, nu am putut observa nici un semn de regenerare a jumătății medulare distruse. În regiunile în care și ganglionii rahidieni au fost vătămați s-au format trunchiuri nervoase noi, ai căror axoni sînt emiși de neuroblaștii jumătății medulare păstrate și care se îndreaptă spre teritoriile periferice corespunzătoare jumătății medulare distruse. Pe traiectul acestor trunchiuri nervoase se găsesc celule nervoase de tip ganglionar (fig. 233, 234 și 235).

2. Distrugerile totale ale tubului neural pe o distanță de 10—11 somite pot fi urmate de procese însemnate de regenerare a substanței medulare și de neoformări de trunchiuri nervoase. La 5 zile după cauterizare se observă astfel, în unele cazuri, regenerarea unei importante regiuni a măduvei distruse. Ceea ce caracterizează procesul de regenerare în această primă perioadă este neoformarea de multiple canale ependimare, care conferă regeneratului un aspect teratoid. Fiecare canal ependimar prezintă un epiteliu dispus regulat, înconjurat de o manta de neuroblaști. Ca și în măduva normală, găsim o activitate cariokinetică intensă în peretele acestor cavități ependimare. Regenerarea măduvei pornește deci de la canalul ependimar neoformat (fig. 236, 237, 238 și 239).

Regeneratele sînt mult mai bine vascularizate decît tubul neural normal de aceeași vîrstă ; plexurile vasculare perimedulare prezintă aici o bogăție deosebită.

Uneori se poate observa, în canalul rahidian golit, formarea unui trunchi nervos de legătură între cele două capete medulare libere, care delimitează defectul experimental (fig. 238). În acest canal, în ținutul necuprins încă de procesul de regenerare poate lua naștere un țesut mezenchimatos bogat vascularizat, în care persistă (fapt destul de curios) și chiar se intensifică reacția fosfatazei alcaline[1]) (fig. 240). În acest țesut mezenchimatos, după cum vom arăta mai jos, pot înainta trunchiurile nervoase neoformate, produse de capătul cranial al măduvei restante sau regenerate. Aceste trunchiuri, părăsind canalul rahidian — acum golit de măduvă —, se îndreaptă spre teritoriile periferice, inervîndu-le.

În a doua perioadă, începînd cu a 12-a zi de incubație, aspectul teratoid al regeneratului medular dispare treptat. Canale ependimare supranumerare nu se mai văd; în schimb, raportul dintre substanța cenușie și cea albă nu este încă normal; substanța cenușie este neregulat repartizată în masa medulară, lipsind diferențierea netă a coarnelor anterioare sau posterioare (fig. 241).

Pentru a observa pe embrionul viu formarea punților de legătură între cele două capete medulare care delimitează leziunea, am împiedicat cicatrizarea tegumentului în regiunea operată. Figura 236 arată, la un asemenea caz, aspectul macroscopic al punții de legătură între capetele măduvei separate de defectul operator.

Distingem trei categorii de trunchiuri nervoase neoformate (regenerate) găsite în preparatele noastre. În cazul hemidistrugerii măduvei, neoformarea de trunchiuri nervoase se face de către jumătatea restantă a măduvei. Aceste trunchiuri, trecînd în partea opusă leziunii experimentale, inervează teritoriile corpului embrionar aparținînd neuromerelor afectate. O altă categorie de trunchiuri nervoase neoformate părăsesc măduva lezată, din partea ei ventrală (fig. 242) și traversează sclerotomul, viitorul corp vertebral, în direcție dorso-ventrală. Reamintim că asemenea trunchiuri s-au putut observa și într-un caz de spina bifidă spontană (fig. 225).

O a treia categorie de trunchiuri neoformate pornesc din capătul central al măduvei restante. Trunchiurile cresc înspre segmentele distale înăuntrul canalului rahidian golit de măduvă, (fig. 243, 244, 245).

Acest contingent de trunchiuri axiale este — în toate cazurile examinate de noi — emis numai de capătul central al măduvei restante. Acest fapt trebuie subliniat. Trunchiurile neoformate, în număr de circa patru—cinci, formează un fel de „coadă de cal". După ce au străbătut canalul rahidian sau regiunea homoloagă a canalului rahidian, pe o distanță de mai multe metamere, fasciculele nervoase regenerate își schimbă direcția axială (longitudinală, cranio-caudală) și se îndreaptă spre regiunile laterale, adiacente în dreapta și în stînga canalului rahidian golit.

În cazurile de distrugere a măduvei cu păstrarea intactă a ganglionilor rahidieni, aceștia apar legați de teritoriile lor periferice printr-un trunchi nervos care reprezintă contingente de fibre aferente ale celulelor ganglionare (protoneuronilor senzitivi) (fig. 245). În majoritatea cazurilor observate, ganglionii rahidieni și-au pierdut orice legătură cu canalul rahidian. Pe secțiunile seriate nu se poate descoperi nici o urmă a unei rădăcini posterioare în legătură cu acești ganglioni.

În unele cazuri, însă, am găsit formațiuni cu valoarea morfologică a unor rădăcini posterioare, care, avînd originea în ganglionii rahidieni restanți, au putut să fie urmărite pînă în canalul rahidian, unde — urmînd o cale ascendentă — se îndreptau spre capătul central al măduvei restante.

[1]) Reacția este intensă în măduva nevătămată.

Aceste observații sînt în concordanță cu vechile descrieri, îndeosebi ale lui Monakov, care au fost citate cu ocazia discuției malformațiilor spontane ale măduvei și canalului rahidian la om. Într-adevăr, în cazurile de amielie cu mielorahischizis, ganglionii rahidieni (de multe ori păstrați) emit trunchiuri cu valoare morfologică de rădăcini posterioare. Aceștia formează cordoane ascendente înăuntrul canalului rahidian.

Pe cînd formațiunile descrise mai sus reprezintă efectul regenerării ramurii centrale a axonului ganglionar, majoritatea trunchiurilor neoformate axiale se îndreaptă, după ce au părăsit capătul central al măduvei restante, spre contingentul de fibre aferente ale ganglionilor rahidieni, avînd exact dispoziția topografică a unor rădăcini anterioare. Dispoziția pe care o au aceste fascicule nervoase neoformate, după ce au părăsit canalul rahidian, ne face să bănuim că este vorba de fibre motorii (fig. 245).

Prin alăturarea lor la fibrele aferente ganglionare, venite de la periferie, ele completează, în zona afectată, un nerv rahidian mixt.

Comparînd însă acest nerv rahidian, din cazurile noastre operate, cu nervul rahidian normal la embrionul de aceeași vîrstă și în aceeași regiune, constatăm că în cazurile experimentale acest trunchi este anormal de subțire (fig. 246). Totuși, în cazurile noastre operate, membrele corspunzătoare măduvei afectate s-au arătat a fi normal inervate (fig. 247).

În cazul lipsei ganglionului rahidian, trunchiurile neoformate, părăsind canalul rahidian, se îndreaptă fie direct spre periferie, fie spre ganglionul simpatic, imitînd o ramură comunicantă. Descrierea noastră se referă la observațiile făcute la embrionii operați în a treia zi de incubație, fixați între a 7-a și a 12-a zi de incubație.

Într-un număr restrîns de cazuri s-au observat și malformații ale membrelor în dreptul leziunilor experimentale ale măduvei. Mugurii membrelor au devenit conici, anormali, nu s-au mai diferențiat segmentele membrelor, degetele etc. Apariția acestor malformații a putut fi urmărită pas cu pas pe embrionii vii din primele zile după operație. Alteori am observat și degete supranumerare (fig. 248, și 249).

Într-un caz am obținut un defect al peretelui antero-lateral al trunchiului, corespunzător regiunii lezate a măduvei. Am găsit aici un regenerat medular în faza a doua, cu aspect de măduvă dezorganizată, un defect important al arcurilor vertebrale, o asimetrie a întregii regiuni dorsale a embrionului, lipsa unor piese cartilaginoase și vertebrale și lipsa musculaturii în regiunile dorsale și antero-laterale, corespunzătoare leziunii (fig. 250). Nu este exclus ca în acest caz să se fi produs și o lezare importantă a somitelor în timpul electrocauterizării. Din peretele trunchiului nu persistă decît un singur rînd de celule epiteliale, care acoperă direct corpul Wolff.

În aproape toate cazurile examinate histologic am observat modificări mai mult sau mai puțin importante ale coardei dorsale, care prezintă deformări și de multe ori dedublări sau chiar triplări, modificări ale coastelor și ale corpurilor vertebrale, ale arcurilor vertebrale și ale musculaturii (fig. 251).

Rezultatele arătate evidențiază plasticitatea măduvei embrionare, care se manifestă prin posibilitățile de regenerare și de refacere a legăturilor cu periferia, formîndu-se noi trunchiuri nervoase cu valoare morfo-funcțională de rădăcini anterioare sau posterioare. Această compensare a defectelor experimentale merge pînă la realizarea unei rețele nervoase suficiente pentru a permite dezvoltarea nestingherită a extremităților pînă în ziua a 12-a de incubație.

Numeroși cercetători s-au ocupat de problema plasticității măduvei embrionare. Astfel este cunoscut că „încărcarea" periferiei prin implantare de organe în creștere,

membre sau alte organe (Detwiler) are drept consecinţă hipertrofia porţiunilor medulare corespunzătoare; invers, distrugerea unui membru în creştere produce o reducere corespunzătoare a diferenţierii în măduvă, în măduva prelungită şi chiar în creier (Dürken).

Posibilităţile de regenerare a măduvei embrionare sînt admise de majoritatea cercetătorilor.

În experienţele noastre, în toate cazurile de regenerare a măduvei. am întîlnit constant in primele stadii o neoformare de multiple canale ependimare. Am semnalat prezenţa unei dedublări a canalului ependimar într-un caz de mieloschizis spontan la embrionul de găină. L. Waelsch a observat încă de mult la embrionul de găină, căruia i-a injectat roşu-Scharlach sub placa embrionară, multiplicarea canalelor ependimare. Într-un caz, el a găsit nouă canale ependimare. Noi am putut obţine într-un regenerat, în apropierea unui defect de cauterizare, şase canale ependimare. Fischel, Zingerle şi Oellacher au obţinut dedublări ale canalului ependimar la embrionul de găină prin apăsări.

Într-un caz de spină bifidă lombară, Gh. Marinescu şi St. Drăgănescu au descris, la o tînără de 24 de ani, o dedublare a măduvei lombare. Multiplicitatea canalelor ependimare denotă o intensă activitate de regenerare. În celulele din jurul acestor canale neoformate se constată aceeaşi activitate mitotică mare, ca şi în histogeneza normală în jurul unicului canal ependimar normal (cariokineze ,,ventriculare"). Producerea dedublărilor caracterizează de multe ori procesele de regenerare în timpul ontogenezei embrionare.

Este meritul şcolii romîne de neurologie, în frunte cu Gh. Marinescu, de a fi atras atenţia asupra importanţei fermenţilor ca factori de seamă în procesele de regenerare ale sistemului nervos.

În ultimul timp, biochimişti sovietici, în deosebi E. Kreps, Petrova ş. a., au studiat activitatea enzimatică din sistemul nervos central în timpul ontogenezei. Kreps a arătat că, la început, activitatea enzimatică e mai puternică în măduvă, apoi scade pe măsură ce se dezvoltă segmentele superioare ale sistemului nervos central. După decerebrare se constată o nouă creştere compensatoare în segmentele inferioare (măduva).

Cercetările făcute împreună cu C. Rîmniceanu şi C. Miclea asupra rolului unor fermenţi (fosfataza alcalină) în dezvoltarea morfo-funcţională a sistemului nervos central şi periferic la embrionul de găină au dovedit creşterea concentraţiei fosfatazei alcaline, în regiunile în care se desfăşoară procese morfogenetice funcţionale intense.

Noi am început studiul activităţii enzimatice la embrionii operaţi, la care se petrec procese de regenerare şi compensare al sistemului nervos central. Într-o serie de experienţe în care am distrus veziculele cerebrale într-o fază precoce a dezvoltării (50 de ore de incubaţie), am putut obţine embrioni ,,vii decapitaţi". În aceste cazuri, activitatea fosfatazei alcaline devine foarte intensă, cuprinzînd măduva în întregime. Se constată deci, în conformitate cu cercetările lui Kreps, o reactivare a activităţii enzimatice în măduvă, în cazul lipsei centrilor nervoşi superiori (fig. 252).

În perioada postoperatoare, pe lîngă procesele de regenerare a măduvei am putut observa — cum s-a arătat — neoformarea de trunchiuri nervoase cu traiecte tipice sau atipice.

Într-un caz de mieloschizis spontan — descris mai înainte — ne-a impresionat prezenţa unui trunchi nervos care pleacă din regiunea comisurii anterioare a măduvei pe linia mediană şi se îndreaptă spre corpul vertebrei. Este interesant că în multe din seriile noastre, provenite de la cazuri în care s-a intervenit asupra măduvei, am putut observa trunchiuri asemănătoare. Aceste trunchiuri străbat sclerotomul în direcţie dorso-ventrală

și se află ulterior, pe măsura formării corpului vertebral, înăuntrul unui canal în interiorul vertebrei. Unele dintre aceste trunchiuri reintră din nou, după un traiect mai mult sau mai puțin lung, în canalul rahidian.

Comportarea asemănătoare a măduvei lezate, în cazurile experimentale și în cazurile de malformații spontane, denotă solicitări asemănătoare ale reactivității morfogenetice a primordiilor nervoase, în ambele cazuri.

Interpretăm drept efectul interacțiunii sistemului nervos cu organele periferice apariția trunchiurilor neoformate.

Numeroși experimentatori au putut obține trunchiuri nervoase neoformate, fie implantînd embrionului organe embrionare în creștere, fie mutînd inserțiile normale ale membrelor. În toate aceste cazuri, pe care nu le putem descrie aici în detaliu, s-a putut constata, fie o abatere a trunchiurilor nervoase existente spre organele implantate, fie o neoformare de trunchiuri nervoase care se îndreptau spre organul implantat. În toate aceste cazuri, însă, era vorba de efecte de adaptare a unei măduve intacte. În cazurile noastre, neoformarea trunchiurilor nervoase se obține lăsînd intacte organele periferice, care-și manifestă influența lor asupra sistemului nervos central lezat prin provocarea dezvoltării acestor trunchiuri noi.

Rezultatele experiențelor noastre nu ne permit, deocamdată, să ne exprimăm în favoarea sau defavoarea uneia din cele trei ipoteze emise pentru explicarea orientării fibrelor și trunchiurilor nervoase în creștere, care se îndreaptă spre teritoriile sau organele periferice. Ne referim la teoria chimiotaxiei, la cea a neurobiotaxiei (A. Kappers) și la cea a structurilor conducătoare preexistente.

Faptul că noi am găsit trunchiurile neoformate plecînd numai de la capătul central al măduvei, pare să verifice influența fasciculelor cerebrale și bulbare descendente și în general al etajelor superioare asupra neuroblaștilor medulari care regenerează axonii lor (dacă nu este vorba de înseși fasciculele descendente).

Experiențele noastre dovedesc că ganglionii rahidieni pot persista și în absența segmentului medular corespunzător, asigurînd cîtva timp, prin prelungirile periferice, unicul contact dintre periferie și un centru nervos. Trunchiurile axiale regenerate, despre care am vorbit, părăsind canalul rahidian, aduc ulterior contingentul medular, probabil motor, acestor trunchiuri de legătură dintre ganglion și periferie.

Prezența unor celule nervoase de-a lungul trunchiurilor neoformate sugerează ideea posibilității unei migrări suplimentare de contingente de celule nervoase din tubul neural.

În momentul cînd cauterizăm măduva, deci în a treia sau a patra zi de incubație membrele se găsesc sub imboldul necesar primelor lor faze de diferențiere. Inervația restantă după operație și trunchiurile nervoase regenerate se arată suficiente pentru a permite diferențierea morfo-funcțională normală a membrelor pînă în a 12-a zi de incubație.

Într-adevăr, noi am găsit membrele, în aproape toate cazurile examinate histologic, în dreptul defectelor medulare inervate.

Observarea curentă, zi de zi, a acestor embrioni vii ne-a permis să urmărim nu numai creșterea și dezvoltarea membrelor în dreptul segmentelor lezate, ci și apariția primelor mișcări ale acestor membre. Observațiile noastre asupra mișcărilor embrionului concordă cu observațiile lui Volohov. Forma și mișcările membrelor inferioare în cazurile de electrocauterizări ale măduvei lombo-sacrate s-au menținut normale pînă în a 12-a zi. Numai în trei cazuri operate de noi, membrele inferioare sau cele superioare — în intervențiile pe măduva cervico-dorsală — au fost oprite în dezvoltare, luînd o formă conică. Nu este exclus ca, în aceste cazuri, să se fi produs, într-o oarecare măsură, o vătămare

a somitelor. În toate celelalte cazuri, cum am spus, dezvoltarea s-a desfăşurat normal pînă în a 12-a zi.

Abia din ziua a 15-a sau a 16-a embrionii operaţi au prezentat tulburări morfo-funcţionale manifeste. Poziţiile vicioase (fig. 231 şi 232) şi absenţa mişcărilor spontane constatate începînd de la această dată ne arată că regenerările care au avut loc şi au putut satisface exigenţele proceselor de ontogeneză pînă la această perioadă au devenit acum insuficiente, continuarea unei dezvoltări morfo-funcţionale normale necesitînd, din acest moment, integritatea sistemului nervos central şi periferic.

În legătură cu aceste fapte poate fi folosită şi observaţia amintită mai sus, a unui pui proaspăt eclozat, căruia i s-a făcut, în a treia zi de incubaţie, o simplă deschidere a tubului neural caudal (mieloschizis). Imediat după ecloziune, acest animal a putut să stea în picioare şi să meargă. Abia după două zile, adică pe măsură ce acest organism a suferit excitaţiile şi exigenţele noului său mediu, a început să se manifeste insuficienţa sistemului său nervos lezat anterior şi s-au instalat progresiv o paraplegie şi o atrofie a musculaturii membrelor inferioare.

Observaţiile noastre concordă în multe privinţe cu rezultatele obţinute de V. Hamburger cu ocazia cercetărilor sale asupra regenerării sistemului nervos la amfibieni. Membrele în dezvoltare ale larvelor de anure, experimental denervate, au prezentat o încetinire în procesul de creştere, paralizii şi atrofii musculare. Această oprire din creştere a apărut însă numai la cîteva săptămîni după operaţie şi a persistat o anumită perioadă de timp.

Cercetările noastre experimentale sînt abia la începutul lor. Ne propunem să continuăm studiul activităţii enzimatice la nivelul măduvei şi trunchiurilor în regenerare, studiul mielogenezei acestor trunchiuri şi efectul distrugerii prealabile a membrelor asupra intensităţii şi ritmului proceselor de regenerare din sistemul nervos central şi periferic al embrionului. Vom trece la studiul neuroinfecţiilor embrionare.

Darwin a conceput regenerarea ca o recapitulare a anumitor stadii ontogenetice. Regenerarea devine astfel un mijloc de studiu al ontogenezei sau, invers, cunoaşterea ontogenezei permite înţelegerea proceselor de regenerare. În experienţele noastre regenerarea măduvei porneşte — cum s-a văzut — de la neoformarea tubului neural; se reia deci un stadiu iniţial al ontogenezei.

Credem că procesele de regenerare nu pot fi înţelese dacă nu sînt concepute ca efectul interacţiunii dintre părţile constitutive ale organismului embrionar şi toţi ceilalţi factori ontogenetici, interacţiune care-şi schimbă caracterul în fiecare stadiu de dezvoltare.

Începînd cu a opta şi a noua zi de incubaţie putem observa, în măduva şi în ganglionii rahidieni ai embrionului de găină, semnele morfologice ale instalării unei noi faze funcţionale.

Pînă la această dată, pericarionii erau repartizaţi, în mod uniform, în ganglionul rahidian, neprezentînd diferenţe structurale de diferenţiere. Celulele ganglionare, de tip bipolar, primesc dintr-o parte prelungirea aferentă, ale cărei neurofibrile se pot urmări pînă în interiorul citoplasmei polului periferic al celulei, iar pe de altă parte emit prelungirea centrală, mai fină, ce se îndreaptă spre rădăcina posterioară.

Începînd cu ziua a noua de incubaţie observăm apariţia unei diferenţieri morfologice care cuprinde însă numai o parte a celulelor din ganglionul rahidian. Grupurile celulare situate în partea ventrală (îndreptate spre nervul rahidian) au devenit

mult mai mari decît celulele situate în partea dorsală a ganglionului. Impregnația argentică pune în evidență în aceste celule mai mari o rețea neurofibrilară foarte bogată, în legătură cu axonul aferent, iar unele dintre aceste celule, prin apropierea prelungirii centrale de cea periferică, pregătesc apariția tipului unipolar.

Preparatele dau impresia că procesul de maturare funcțională, adică de instalare a funcției specifice, cuprinde succesiv elementele ganglionului și că în contingentul său celular rămîn rezerve funcționale sub forma unor celule încă neantrenate în acest proces de maturație morfo-funcțională. În același timp se pregătește și diferențierea tipurilor de celule ganglionare.

În a 12-a zi de incubație, procesul descris este și mai evident și se pot găsi primele celule ganglionare unipolare (fig. 253, 254 și 255).

Fenomene corespunzătoare putem găsi și în neuroblaștii medulari. În a 12-a zi de incubație, grupele caracteristice ale substanței cenușii sînt individualizate, celulele motorii ale coarnelor anterioare prezintă o bogată rețea de neurofibrile intracitoplasmatice și toate caracterele morfologice ale pericarionilor motori în funcțiune. Metodele de impregnație folosite de noi (A g d u r, T i o i ț k i) ne permit, începînd abia cu a 11-a zi de incubație, să descoperim în musculatura striată terminații nervoase (fig. 256).

Toate aceste date morfologice ne întăresc convingerea că în jurul celei de a 12-a zile de incubație are loc la embrionul de găină un salt calitativ funcțional (pregătit începînd cu a opta și a noua zi) în relațiile dintre sistemul nervos (central și periferic) și organele inervate.

Modificările morfologice descrise, observabile la embrionii normali, sînt în concordanță cu datele funcționale obținute cu ocazia studierii embrionilor cărora li s-a distrus măduva la nivelul membrelor inferioare. Cum s-a menționat mai sus, această distrugere nu influențează, în majoritatea cazurilor operate, diferențierea normală a membrelor pînă în a 12-a zi de incubație, dată de la care se instalează primele tulburări funcționale și trofice despre care s-a vorbit.

Rezultatele obținute prin metoda distrugerilor locale ale măduvei embrionare, privite în ansamblu, scot în evidență manifestările de compensare și regenerare de care se arată capabilă măduva embrionară. Pe cînd în cultura de țesut neuroblaștii dau naștere de obicei unor axoni care cresc neregulat în direcții diferite, în ansamblul complexului embrionar, fasciculele nervoase neoformate pe care le-am descris se îndreaptă urmînd anumite căi spre organele periferice. Acest fapt bine cunoscut din literatură — foarte bogată în acest domeniu — constituie unul dintre cele mai frumoase exemple de efecte morfogenetice datorite interacțiunii dintre organele embrionare.

O semnificație deosebită pare să aibă observația, verificată în toate cazurile noastre experimentale, a concentrației activității regeneratoare la capătul central al măduvei restante, capăt care se arată capabil să emită trunchiurile nervoase neoformate.

Acest fapt ne sugerează posibilitatea unor influențe ale centrilor nervoși superiori, ale creierului și fasciculelor de proiecție care se dezvoltă în nevrax în direcție centrifugală (cranio-caudală). Într-un volum următor vom reda rezultatele unor cercetări în curs, care constau în întreruperi multiple ale tubului neural embrionar și în determinarea capetelor „active" în ceea ce privește regenerarea. De asemenea vom încerca să obținem informații asupra funcționalității sistemului nervos în aceste perioade ontogenetice prin cercetarea activității colinesterazice a terminațiilor nervoase.

Un interes deosebit îl prezintă reapariţia tubului ependimar simplu la începutul proceselor de regenerare a măduvei, fapt care confirmă concepţia darwinistă despre regenerare ca o repetare a unor faze ontogenetice.

Datele noastre experimentale pledează pentru o dezvoltare succesivă a relaţiilor dintre sistemul nervos şi organele inervate. Astfel, inervaţia membrelor pe baza procesului de regenerare se arată suficientă pentru diferenţierea lor într-o primă perioadă a dezvoltării, dar ea devine apoi insuficientă pentru exigenţele acestui proces într-o perioadă următoare, în care integritatea sistemului nervos este absolut necesară dezvoltării normale a organelor periferice.

INTERVENŢII ASUPRA VEZICULELOR CEREBRALE. CERCETĂRI ASUPRA EFECTELOR REDESCHIDERII ROMBENCEFALULUI ŞI A ROLULUI LICHIDULUI EPENDIMAR ÎN DEZVOLTAREA CREIERULUI

La dezvoltarea veziculelor cerebrale ale embrionului de pasăre ne impresionează în mod deosebit acumularea unor cantităţi relativ mari de lichid ependimar. Dimensiunile veziculelor cerebrale şi îndeosebi ale mezencefalului dau impresia că ele se dezvoltă sub influenţa presiunii hidrostatice a lichidului acumulat în interiorul lor. Embrionii păsărilor diferă, prin acest aspect, de embrionii mamiferelor, la care veziculele cerebrale nu ajung la asemenea dimensiuni.

Cavităţile ependimare nu sînt singurele spaţii închise ale corpului embrionului care prezintă în această perioadă de dezvoltare o acumulare mare de lichid. Concomitent cu creşterea lichidului ependimar şi dezvoltarea corespunzătoare a veziculelor cerebrale putem observa acumularea lichidului amniotic, a lichidului din vezicula alantoidiană şi a lichidului subembrionar. Amniosul reprezintă, după închiderea lui în a treia zi de incubaţie, un înveliş aplicat strîns pe suprafaţa corpului embrionului. Abia spre sfîrşitul celei de a treia zile şi mai cu seamă în a patra zi de incubaţie se dezvoltă acvariul amniotic, care permite embrionului executarea unor mişcări nestînjenite. Vezicula alantoidiană, care începe să se vadă în a patra zi de incubaţie, între membrele inferioare la capătul caudal al embrionului şi proeminînd în celomul extraembrionar, formează un sac cu perete bistratificat (mezo- şi endoderm) umplut cu lichid. Conţinutul lichid al acestei vezicule este în continuă creştere în a patra şi a cincea zi de incubaţie. Începînd cu a patra zi de incubaţie, acumularea lichidului subembrionar atinge un maximum de intensitate, proces care va fi descris mai în amănunt într-un capitol următor. Sursa lichidului care se acumulează în toate aceste cavităţi este rezervorul general de apă al embrionului: albuşul.

O serie de cercetări a arătat în mod neîndoelnic existenţa unui intens transfer de apă din albuş în sacul vitelin şi corpul embrionului, care se accentuează cu sfîrşitul celei de a treia zile de incubaţie.

Diferenţierea veziculelor cerebrale progresează în condiţiile acumulării de lichid în lumenul lor.

În toate cazurile de neînchidere spontană a tubului neural cefalic (mieloschizis cerebral, exencefalie, anencefalie) şi în care nu poate să fie vorba de o acumulare de lichid ependimar, masa cerebrală rămîne totdeauna în urmă ca dezvoltare.

Un factor care pare să joace un rol însemnat în acumularea lichidului ependimar în veziculele cerebrale este reţeaua capilară care se dezvoltă pe suprafaţa creierului embrionar. Începînd cu ziua a doua de incubaţie putem observa la embrionul viu (cu lupa

binoculară sau cu ultropacul) dezvoltarea rețelei capilare pe suprafața veziculelor cerebrale și modul de circulație în această rețea. În a patra zi, rețeaua capilară devine bogat anastomozată, ca în zilele următoare să se formeze adevărate sinuri vasculare, realizînd o irigație continuă și rapidă a suprafețelor cerebrale printr-un adevărat film de sînge (fig. 275, 276 și 277). Cu toate că și măduva embrionară posedă un bogat plex vascular periferic, putem afirma că nici o parte a sistemului nervos central nu prezintă o vascularizație atît de intensă ca veziculele cerebrale, în această perioadă de dezvoltare.

În faza preorganică, cînd peretele veziculelor cerebrale este reprezentat de un țesut epitelial, vasele rămîn la suprafața externă a acestui perete. Pe măsura însă în care începe diferențierea pereților cerebrali, cînd neuroepiteliul se transformă într-un organ (format din mai multe țesuturi) capilarele pătrund din plexul periferic în grosimea substanței nervoase.

Sinurile vasculare periveziculare sînt probabil o importantă sursă a lichidului cefalorahidian primar (lichidul ependimar), înaintea formării plexurilor coroidiene și a instalării funcțiilor lor secretoare. Lichidul transsudat din vase străbate neuroepiteliul pînă în lumina ventriculilor.

Plexurile periveziculare par însă a fi tot atît de apte a resorbi substanțe secretate la nivelul țesutului nervos embrionar și de a le transmite prin circulație restului corpului embrionar și anexelor sale vascularizate.

Este important că la unele vertebrate superioare și la om se formează, în cursul dezvoltării embrionare, comunicări — „ventile de siguranță'' — între cavitățile ependimare conținînd lichidul cefalorahidian și spațiul subarahnoidian (canalele Luschka și Magendie). În timpul ontogenezei embrionare, prezența acestor comunicări pare să asigure, printre altele, posibilitatea unei echilibrări a tensiunii intraependimare (ventriculare).

Toate aceste considerații ne-au îndemnat să întreprindem, împreună cu M. Deleanu, studii experimentale asupra importanței acumulării lichidului ependimar primar pentru dezvoltarea veziculelor cerebrale.

Intervenția pe care o executăm în acest scop constă în principiu în redeschiderea tubului neural la nivelul rombencefalului, la embrionul ajuns la sfîrșitul celei de-a doua zile de incubație. În acest moment a început torsiunea laterală a capului despre care a fost vorba într-un capitol anterior (anexa III), iar veziculele cerebrale, în afară de rombencefal, sînt acoperite cu cuta cefalică a amniosului.

Colorind vital, printr-un portcolorant de agar (care conține albastru de Nil) regiunea cefalică a unui asemenea embrion, putem recunoaște cu ușurință, după îndepărtarea portcolorantului, tubul neural, somitele adiacente, rombencefalul și cuta amniotică cranială, care maschează capul, lăsind însă tocmai rombencefalul liber. Un important reper pentru locul intervenției noastre îl constituie vezicula otică, care se colorează totdeauna, chiar după un contact foarte scurt cu portcolorantul, și care ne indică regiunea rombencefalului în care trebuie să intervenim. Cu instrumentul operator incizăm, în dreptul veziculei otice, tavanul — rămas subțire — al rombencefalului, prelungind incizia caudal și cranial față de vezicula otică.

În felul acesta permitem lichidului ependimar din lumina veziculelor cerebrale și în primul rînd a mezencefalului să comunice liber cu lichidul periembrionar și mai tîrziu cu lichidul amniotic. În asemenea condiții, tensiunea lichidului ependimar nu poate să ajungă la valorile ei normale.

După executarea operației descrise, lăsăm embrionul să se dezvolte observîndu-l zilnic prin fereastra oului.

La o parte dintre embrionii operați, orificiul creat în tavanul rombencefalului se închide spontan. La alți embrioni operați se observă obturarea orificiului de către membrana amniotică, aderentă de regiunea operatoare, sau de către peretele sacului vitelin adiacent. În aceste cazuri — în care orificiul creat de noi se oblitereazā — nu observăm producerea altor modificări secundare intervenției noastre. Aspectul creierului acestor embrioni rămîne normal.

La toți embrionii însă, la care orificiul artificial creat — al rombencefalului — persistă, se instalează modificări importante ale veziculelor cerebrale și îndeosebi ale mezencefalului.

Embrionii operați, observați la 3 zile după intervenție, deci în a cincea zi de incubație, impresionează imediat prin lipsa aspectului normal „balonat” al mezencefalului. Peretele acestei vezicule cerebrale prezintă o serie de cute, are un aspect „dezumflat”, colabat. De asemenea, telencefalul și diencefalul au rămas în urmă cu dezvoltarea (fig. 259, 260, 261, 262 și 264).

În zilele care urmează, mezencefalul capătă un aspect lobat „cerebroid”, începînd să semene cu creierul din cazurile de exencefalie spontană prin neînchiderea tubului neural cefalic, malformație care duce, la toate vertebratele, la configurația numită „anencefalie” (fig. 257 și 258).

Pe cînd în „anencefalie” suprafața lobată a creierului reprezintă fața ependimară (fig. 273 și 274), în cazurile operate de noi prin deschiderea rombencefalului, aspectul lobat al mezencefalului rezultă din creșterea — mai redusă decît în cazurile normale — a pereților veziculei cerebrale rămasă intactă, care se dezvoltă însă în absența tensiunii normale a lichidului ependimar.

În a 12-a zi de incubație putem observa hernii cerebrale prin orificiul rombencefalic, iar apropierea anormală a globilor oculari trădează întîrzierea în dezvoltare a diencefalului (fig. 263).

Aceste experiențe dovedesc rolul tensiunii lichidului ependimar în dezvoltarea normală a veziculelor cerebrale. Considerăm că rezultatele obținute vor putea aduce o contribuție la înțelegerea mecanismului unor forme congenitale de microcefalie sau, în general, a unor aspecte din patologia prenatală a creierului.

DISTRUGEREA PROSENCEFALULUI ȘI MEZENCEFALULUI EMBRIONILOR DE GĂINĂ LA 30–45 ORE DE INCUBAȚIE

Ca material am utilizat, în colaborare cu C. R î m n i c e a n u, oul de rasă Leghorn pe care l-am ferestruit la 30 sau la 45 de ore de la începutul incubației.

Regiunea cefalică a embrionilor s-a colorat înaintea începerii operației, cu ajutorul unui transportor de colorant. Am utilizat agarul îmbibat cu roșu neutru.

Intervenția noastră s-a efectuat într-un moment cînd circulația sanguină, fie că nu se organizase încă, fie că era abia la începutul dezvoltării ei. Traumatizarea regiunii cefalice nu a produs decît o slabă extravazare de lichid, uneori încă anhematic.

Traumatizarea regiunii cefalice s-a efectuat înainte de închiderea amniosului (care are loc în a treia zi de incubație), așa încît membranele extraembrionare și procesul de formare al acestora nu a fost modificat.

În această primă serie de experiențe am căutat să lezăm creierul embrionului de găină într-un stadiu incipient de dezvoltare, cînd veziculele cerebrale sînt încă dispuse „în linie dreaptă”.

Sub controlul lupei și cu ajutorul colorației vitale s-a reperat porțiunea cefalică a tubului neural în regiunea veziculelor pros- și mezencefalice. Aceste vezicule, o dată reperate, au fost distruse cu electrotermocauterul sau amputate cu acul de sticlă curb. În figura 266 am redat schema regiunii asupra căreia s-a efectuat intervenția noastră (dreptunghiul hașurat). Electrotermocauterul de care ne servim este o ansă de platină care transmite căldura unui vîrf foarte fin, adecvat mărimii obiectului de coagulat.

După operație, oul se închide în mod obișnuit și se repune în incubator. Operația aceasta dă două feluri de rezultate:

La unii embrioni, la care am cauterizat veziculele în regiunea descrisă mai sus, rețeaua sanguină extraembrionară pierde legătura cu inima, legătură care în momentul operației este în curs de organizare. Aria vasculară se dezvoltă în aceste cazuri într-un mod deosebit, pe care îl vom descrie într-un capitol următor.

La alți embrioni (circa 10% din embrionii operați), circulația sanguină continuă dezvoltarea ei normală. La acești embrioni, care cresc și se dezvoltă, nu persistă din creier decît bulbul. Vom numi deci acești embrioni „bulbari". La aceștia nu se formează, bineînțeles, nici hipofiza, nici epifiza, nici globii oculari și nici masivul facial. Embrionii bulbari sînt deci lipsiți de cea mai mare parte a capului. Figura 265 și 267 reprezintă un embrion „bulbar" operat la 45 de ore de incubație. Acest embrion trăia la 9 zile de incubație, cînd ne-am hotărît să-l fixăm. Embrionul are jumătate din volumul unui embrion normal. „Bontul" cefalic este acoperit de tegument, gîtul este scurt și gros. Conformația trunchiului și a membrelor este normală. Mugurii penelor s-au format în mod regulat.

În figura 268 redăm un alt tip de embrion „bulbar" la care s-a făcut intervenția tot la 45 de ore de incubație, ca și la cel descris anterior. Pe acest embrion, însă, l-am lăsat să se dezvolte pînă la a 16-a zi de incubație, cînd am hotărît să-l fixăm. Prin bontul cefalic herniază o veziculă chistică ce corespunde cu bulbul malformat. Corpul acestui embrion „bulbar" prezintă o malformație, întîlnită destul de frecvent și în afara oricărei intervenții, și care a constat în lipsa de închidere a peretelui anterior toraco-abdominal (celosomie). Printr-o deschidere largă, viscerele toraco-abdominale herniază. În fotografia noastră se văd stomacul, duodenul, esofagul și intestinele, care cad în afara corpului embrionar. Mugurii pufului s-au dezvoltat bine. Conformația membrelor este normală.

DISTRUGEREA TELENCEFALULUI ȘI A DIENCEFALULUI LA EMBRIONUL DE 50 – 55 DE ORE DE INCUBAȚIE

Acești embrioni sînt, în momentul operației, mai evoluați decît cei din primul grup. La această vîrstă, circulația sanguină este bine dezvoltată și deosebit de intensă la nivelul veziculelor cerebrale. Veziculele sînt acoperite de un plex vascular, formînd pe alocuri adevărate sinuri vasculare. Orice traumatizare provoacă o hemoragie intensă. Numai cupa optică nu sîngerează cînd o traumatizăm. Embrionul este învelit în cea mai mare parte de amnios. La această vîrstă, embrionul stă culcat pe partea stîngă și prezintă deci operatorului partea dreaptă a capului. Pentru a coagula suprafața stîngă (profundă) a capului, este necesar să-l „basculăm" cu ajutorul unui instrument special.

Cu ocazia altor experiențe am putut stabili o comportare interesantă a vaselor capilare embrionare: ușoare traumatizări mecanice, ca loviri bruște cu un instrument bont, produc imediat o stază intensă cu oprirea circulației în ținutul capilar interesat.

Ne folosim de această stază pentru reducerea hemoragiei, operînd după ce o producem în modul descris mai sus.

La embrionii operați la această vîrstă nu am mai obținut distrugerea completă a capului o dată cu distrugerea prosencefalului și a mezencefalului. Procesului formării capului este mult mai avansat în această perioadă de dezvoltare. Leziunile sînt de data aceasta mai localizate.

Prezentăm un prim exemplu redat în figura 269.În acest caz am obținut hemidistrugeri ale feței, telencefalului și ale diencefalului. Operația a fost executată la 50 de ore de incubație. Embrionul a trăit pînă în a 17-a zi de incubație, cînd a fost sacrificat. În figura 269 se vede că embrionul are în regiunea calotei craniene o mare deschizătură în formă de fantă, prin care proemină patru vezicule chistice. Aceasta este tot ceea ce a rămas din telencefal și din diencefal. Ochiul din partea dreaptă nu s-a dezvoltat de loc. Ciocul superior s-a dezvoltat, dar a rămas mic, în raport cu ciocul inferior, dezvoltat normal. Ciocul este „încrucișat", dispoziție tipică, obținută ori de cîte ori lipsește un glob ocular, fapt semnalat încă de E. Wolff. Maxilarul superior deviază înspre partea cu defectul ocular. Acad. C. I. Parhon și Lauriau au obținut în același timp cu noi „ciocul încrucișat" după distrugerea globului ocular.

Aspectul exterior al restului trunchiului și al membrelor este normal. Mugurii pufului s-au dezvoltat bine.

În figura 270 prezentăm rezultatele unei alte experiențe de cauterizare a creierului, la 50 de ore de incubație. Și acest embrion a fost sacrificat la 17 zile de incubație. În acest caz, calota craniană prezintă o despicătură situată în partea dreaptă a liniei mediane, deasupra globilor oculari. Prin ea herniază o veziculă chistică, rest din creierul dezorganizat prin operația efectuată. Cei doi globi oculari nu s-au mai dezvoltat. Maxilarul superior este mai slab dezvoltat decît cel inferior. Restul corpului, membrele, tegumentul și puful nu par influențate în evoluția lor de operație, judecînd după aspectul macroscopic.

DISTRUGEREA GLOBULUI OCULAR

În acest scop am folosit două metode : una directă, microchirurgicală, și alta indirectă, prin extragerea lichidului amniotic. Ambele metode ne-au dat rezultate în privința suprimării dezvoltării ochiului.

În cazul intervenției directe am utilizat transportorul de colorant (agar îmbibat cu roșu neutru). Am reperat la lupă, cu precizie, cupa optică colorată și am cauterizat-o cu grijă, evitînd atingerea țesuturilor înconjurătoare.

Metoda indirectă se bazează pe observația noastră, că scoaterea lichidului amniotic produce uneori — printre alte efecte — oprirea dezvoltării și atrofia globului ocular stîng.

Am arătat mai înainte că la 50 de ore de incubație embrionul de găină este culcat pe partea sa stîngă. Lichidul amniotic protejează partea stîngă a capului de contactul direct cu peretele amniosului. Lipsa lichidului determină contactul direct al părții stîngi a capului cu suportul său. Drept consecință, în unele cazuri, ochiul de partea stîngă nu se mai dezvoltă.

Figura 271 reprezintă embrioni mai evoluați cărora li s-a extras lichidul amniotic. Se observă lipsa completă de dezvoltare a ochiului stîng, respectiv drept, și ciocul încrucișat.

Examenul secțiunilor seriate prin capul unui embrion de găină căruia i s-a distrus globul ocular drept la vîrsta de 50 de ore arată lipsa nervului și tractului optic corespunzător. Diencefalul de partea opusă globului ocular suprimat este atrofiat (fig. 272).

Prima indicație asupra unei legături între lipsa globului ocular și apariția ciocului încrucișat la embrionul de pasăre o găsim la E. Wolff, care descrie pe scurt acest fenomen ca o coincidență între două malformații spontane.

În ceea ce privește rolul globului ocular pentru dezvoltarea masivului facial, putem cita lucrarea lui R. Amprino, care studiază la embrionul de găină efectele suprimării globului ocular asupra dezvoltării mușchilor intraorbitari și a musculaturii feței. După Amprino, prezența globului ocular este hotărîtoare pentru dezvoltarea acestei musculaturi.

Rezultatele constante pe care le obținem după suprimarea ochiului ne îndreptățesc să credem că globul ocular, înainte de a îndeplini funcția sa specifică vizuală, are un rol deosebit de important pentru dezvoltarea întregului masiv facial.

Presiunea egală pe care cei doi globi o exercită la embrion asupra maxilarului superior contribuie ca acesta să se mențină pe planul median. Lipsa globului ocular dintr-o parte are drept consecință devierea ciocului prin contrapresiunea globului antimer rămas intact.

Sîntem aci în fața unui exemplu a unei funcții mecanice exercitată de un organ embrionar, funcție necesară pentru realizarea structurii normale a regiunii întregi, în care se dezvoltă acest organ.

La embrionii „bulbari” s-a observat, cum s-a spus mai sus, o întîrziere în dezvoltarea întregului corp. V. Preda, folosindu-se de tehnica distrugerilor veziculelor cerebrale, a studiat condriomul ficatului la embrioni cărora le-a distrus creierul. Autorul descrie o sărăcire a celulei hepatice în condriom, fenomen care denotă profunde modificări metabolice în acest organ. Putem admite, pe baza acestor observații, că și metabolismul altor organe va fi tulburat. În literatura apărută în ultimul timp s-au găsit indicații asupra creșterii glicemiei la embrionii decapitați. La mamifere, A. Jost a reușit să decapiteze prin strangulare embrionul de șoarece în cornul uterin. Acest autor a cercetat modificările produse după decapitare în restul organismului, prin lipsa glandelor de secreție internă, epi- și hipofiză. T. M. Ivanova a reușit să distrugă creierul la mormolocul de broască, lăsînd însă hipofiza pe loc. În aceste condiții metamorfoza a fost profund tulburată.

Cercetările noastre asupra efectului distrugerii creierului în stadii precoce ale dezvoltării embrionare sînt abia la început. Ele vor cuprinde, în viitor, un studiu amănunțit al activității enzimatice, al dezvoltării funcțiilor organelor embrionare, al reactivității și al posibilității de regenerare în absența creierului.

CERCETĂRI EXPERIMENTALE ASUPRA DEZVOLTĂRII INTERRELAȚIILOR DINTRE SISTEMUL NERVOS ȘI ȚESUTURILE ȘI ORGANELE INERVATE LA EMBRION, ÎN DIFERITE FAZE ONTOGENETICE

Studiul influenței sistemului nervos asupra metabolismului structurilor inervate, înrîurirea inervației asupra troficității și funcționalității, prin intermediul metabolismului, constituie o importantă problemă, cercetată multilateral de școala pavlovistă. Aceste cercetări sînt de o deosebită importanță, nu numai pentru fiziologia organismului în perioada postnatală, ci și pentru înțelegerea dezvoltării embrionului.

Părțile constitutive ale complexului embrionar se dezvoltă în continuă interacțiune. Caracterul acestor interacțiuni se schimbă însă la fiecare treaptă de dezvoltare. La această evoluție a interacțiunilor participă, bineînțeles, și sistemul nervos, în decursul dezvoltării lui înăuntrul complexului embrionar.

Rolul sistemului nervos și neuro-hormonal înăuntrul sistemului de interacțiuni care se dezvoltă în procesul ontogenetic este deosebit de important pentru transformările metabolice, baza diferențierilor morfologice.

În cele ce urmează rezumăm rezultatul unor cercetări experimentale (dintre care unele au fost descrise în capitolele precedente iar descrierea altora va urma), care pledează pentru existența unor trepte evolutive în relațiile sistemului nervos cu țesuturile și organele inervate, în decursul dezvoltării embrionului de găină.

Dacă transplantăm un fragment de tegument embrionar luat de la un embrion de găină de rasă Plymouth (rasă colorată sură) la 7 zile de incubație, în tegumentul dorsal al unui embrion Leghorn (alb), de 3 zile de incubație, observăm regulat (fapt cunoscut în literatură) cum melanoblaștii implantului emigrază în tegumentul gazdei la scurt interval după implantare. Cînd gazda (Leghorn) își formează papilele primordiilor penelor de puf, melanoblaștii străini se multiplică intens, colorînd aceste papile pe întinderi mari.

Același fenomen îl observăm și după implantarea unui heteroimplant de tegument de embrion, de exemplu de fazan pe embrionul Leghorn. Implatul crește colorat și difuzează gazdei Leghorn melanoblaștii săi. O asemenea transplantare, în urma căreia se formează în gazdă un țesut hibrid — format din elemente proprii și străine — o interpretăm în sens miciurinist ca o grefă „de conferire de însușiri noi".

Un fenomen nou îl putem constata dacă implantul nostru provine de la o specie care diferă de gazdă și ca tip de dezvoltare. Cum se știe, embrionii raselor colorate de porumbel (tip de dezvoltare nidicol) au puful nepigmentat; pigmentul lor apare abia după ecloziune, prin melanizarea promelanoblaștilor necolorați, existenți și la embrion.

Dacă transplantăm pe embrionul Leghorn (specie nidifugă, cu rapidă diferențiere neuro-umorală preeclozională) tegumentul embrionar de porumbel, rasa colorată (specie nidicolă cu înceată diferențiere preeclozională) observăm, începînd abia *în a 12-a zi de incubație a gazdei, o colorație prematură a promelanoblaștilor emigrați din implant* (porumbel) în gazdă (Leghorn). Condițiile prezente în tegumentul embrionului Leghorn provoacă deci o „grăbire ontogenetică", adică maturarea și melanizarea promelanoblaștilor de porumbel mult înaintea termenului în care acest fenomen are loc în mod normal însă nu înaintea celei de-a 12 zile de incubare. Implantul, care crește și se dezvoltă, *rămîne el însuși nepigmentat*.

Acest efect, adică apariția prematură a pigmentului de porumbel în tegumentul Leghorn, nu se produce dacă executăm experiența în condiții de „denervare", adică pe un suport anevric cum este corion-alantoida.

Pentru realizarea contactului promelanoblaștilor de porumbel cu tegumentul Leghorn, în afara acțiunii terminațiilor nervoase, transplantăm întîi tegumentul Leghorn pe membrana corion-alantoidiană a oului de găină, iar alături de acest transplant și în contact cu el, tegumentul embrionar de porumbel. Ambele tegumente cresc și se dezvoltă bine pe membrana corion-alantoidiană (care, conform tuturor datelor pe care le posedăm astăzi, nu este inervată), fiind irigate de vasele alantoidiene.

Împreună cu colaboratorul nostru M. Deleanu, ne-am putut convinge că, în aceste condiții, melanizarea promelanoblaștilor implantului de porumbel nu are loc.

Acest fapt experimental ne silește să admitem că terminațiile nervoase tegumentare ale embrionului Leghorn pot influența metabolismul promelanoblaștilor de porumbel, care cresc și se multiplică în acest mediu nou în sensul accelerării formării melaninei. În absența terminațiilor nervoase pe membrana corion-alantoidiană ar lipsi deci un factor pe care-l credem important pentru formarea melaninei.

Este însă important de subliniat că aceleași terminații nervoase ale gazdei Leghorn, care pătrund în implantul de tegument al embrionului de porumbel în condițiile grefării acestuia pe corpul embrionului rasei Leghorn, nu pot determina în grefă melanizarea promelanoblaștilor. Aceasta depinde, în mod evident, de factorii locali tegumentari, legați de caracteristicile de specie și de tipul de ontogeneză al donatorului grefei.

Dar experiențele citate pledează nu numai pentru existența legăturilor dintre inervația și metabolismul tegumentului. Este necesar ca terminațiile nervoase să ajungă la un anumit grad de maturitate ontogenetică, să atingă o anumită *treaptă de eficacitate.*

Am menționat mai înainte că melanizarea promelanoblaștilor de porumbel în tegumentul embrionului Leghorn se observă abia în jurul celei de a 12-a zile de incubație, cu toate că difuziunea lor din implant în gazdă începe în a treia zi de incubație (momentul implantării). Putem admite atingerea unor asemenea trepte de eficacitate (de maturare funcțională) a terminațiilor nervoase în această perioadă ontogenetică în jurul zilei a 12-a de incubație? Experiențele pe care le-am relatat în subcapitolul „cercetări prin metoda distrugerii localizate a măduvei embrionare" pledează în favoarea acestei ipoteze. Să le rezumăm pe scurt:

După distrugerea prin microtermocauterizare a tubului neural în dreptul membrelor inferioare ale embrionului de găină de 3 zile de incubație se observă în unele cazuri tulburări ale diferențierii membrelor care devin conice. Prin această metodă nu se poate obține însă o denervare completă a membrelor. Persistă ganglionii rahidieni și din partea restantă a tubului neural pătrund trunchiuri nervoase regenerate în teritoriul defectului. Comparația cu martorii normali arată însă subțiimea anormală a trunchiurilor nervoase care inervează asemenea extremități. Lăsînd embrionii operați să se dezvolte mai departe, putem observa o continuare normală a creșterii și dezvoltării membrelor inferioare pînă la a 12-a zi de incubație. Abia în acest moment încep să se instaleze tulburări funcționale și trofice. Mișcările membrelor — vii în mod normal la această dată — încetează complet. Apare o contractură, o poziție vicioasă a degetelor. Această experiență ne arată că defectul medular și al inervației periferice nu împiedică într-o primă perioadă diferențierea membrelor; începînd însă cu un anumit moment al ontogenezei, situat în jurul celei de-a 12-a zile de incubație, integritatea sistemului nervos devine necesară pentru continuarea normală a procesului de dezvoltare. Defecte spontane sau experimentale ale segmentelor superioare ale sistemului nervos central nu ne-au permis deocamdată să decelăm trepte funcționale evolutive delimitabile ale relațiilor terminațiilor periferice cu substraturile inervate în timpul ontogenezei embrionare (cercetări efectuate în colaborare cu C. Rîmniceanu și C. Miclea).

Așa cum am arătat în capitolul precedent, decapitarea embrionului de găină prin distrugerea veziculelor cerebrale la 50 de ore de incubație (cercetări efectuate în colaborare cu C. Rîmniceanu și C. Miclea) permite uneori o supraviețuire pînă la a 16-a zi de incubație. În asemenea cazuri se remarcă o întîrziere în dezvoltarea embrionului, care prezintă dimensiuni mai mici față de normal; în alte cazuri se observă malformații. V. Preda, lucrînd cu această tehnică, a găsit o diminuare a condriomului hepatic.

Cercetările citate pledează pentru faptul că raporturile, interacțiunile, dintre componenții complexului embrionar, își schimbă caracterul de-a lungul etapelor succesive ale ontogenezei.

BIBLIOGRAFIE

1. Amprino R., Acta anatomica, 1950, vol. X, fasc. 1—2.
2. Ancel, *Recherches expérimentales sur la Spina bifida*, Arch. d'anat. microscop. et de morphol. expér., 1946—1947, t. 36, nr. 1, p. 45.
3. Braus H., *Die Entstehung der Nervenbahnen*, Vortr. Ges. d. Naturf. u. Ärzte. Verhandl., 1911, p. 114.
4. Campenhout E. v., *Le développement du système nerveux sympathique chez le poulet*, Arch. Biol., 1931, t. XLII, p. 479.
5. Kreps E. M., *Carboanhidraza în sistemul nervos*, Anal. rom.-sov., seria medicină, 1951, nr. 51.
6. Dantschakoff V., *Der Aufbau des Geschlechtes beim höheren Wirbeltier*, Jena, G. Fischer, 1941.
7. Detwiler S. R., *Neuroembryology, An Experimental Study*, NewYork, Mac Millan, 1936, p. 218.
8. Dürken B., *Experimental Zoologie*, Berlin, Gebrüder Bornträger, 1928.
9. Fowler I., *Responses of the Chick Neural Tube in Mechanically produced Spina bifida*, J. Exp. Zool. 1953, vol. 123, p. 115.
10. Hamburger V., *Experimentelle Baiträge zur Entwicklungs-physiologie der Nervenbahnen i. v.*, Roux Arch. f. Entwmech., 1928, nr. 114, p. 272.
11. Hammond W. S., *Formation of the Sympathetic Nervous System in the Tronc of the Chick Embryo following removal of the thoracic neural tube.* J. Comp. Neur., 1949, t. 91, p. 67.
12. Harrison R. G., *Further Experiments on the Development of Peripheral Nerves*, Amer. J. of. Anat., vol. 5. 1906.
13. — *The Outgrowth of the Nerve Fibre as a Mode of Protoplasmic Movement*, J. of. exper. Zool. 1910, nr. 9, p. 787.
14. Jost A., *Expérience de décapitation de l'embryon de lapin*, C. R. Acad. Sci., iul. 1947, 225, p. 322.
15. Levi-Montalcini, *Recherches expérimentales sur la morphogénèse des nerfs craniens chez l'embryon de poulet*, Bull. d'histol. appl. 1946, t. XXIII, nr. 3, p. 25.
16. — *Les conséquences de l'extirpation du rhombencéphale sur le développement de l'embryon de poulet*, Bull. d'histol. appl. 1946, t. XXIII, nr. 3, p. 45.
17. Levinson L. B. și Leikina M. I., *Studiul morfologic și histochimic al neuronilor motori și senzitivi ai embrionului de găină în diferite etape ale dezvoltării ei*, DAN SSSR, vol. 109, nr. 1, 1956.
18. Marinescu Gh., *Verschiedene Abhandlungen*, Rev. neur., 1905, 1906, 1907; Presse méd., 1907; Rev. générale des sciences pures et appliquées, 1907.
19. Marinescu Gh. et Drăgănescu S., *Spina bifida lombaire. Rachischisis sacré. Anomalies multiples de la moëlle lombo-sacrée (Dyasthématomyélie, moelle double, prolongement anormal de la moëlle). Kyste épidermoïde spinal (Etude histo-pathologique)*, Ann. d'anat. pathol. et d'anat. méd. chir., 1929, nr. 4, p. 354—374.
20. Marinescu Gh. și Minea I., *Régénérescence des fibres du système nerveux central*, J. Physiol. u. Neurol., 1910, nr. 17.
21. — *Recherches de la régénérescence des nerfs périphériques*, Rev. neurol., 1907.
22. — *Recherches anatomo-cliniques sur les névromes d'amputation douloureux*, Philosoph. Trans. Lond. Roy, Soc. B., 1919, nr. 209.
23. Menkes B., *Aplicarea metodei mentorului în dezvoltarea embrionară la animale. I. Transplantare de tegument embrionar aparținînd la rase diferite de găină*, Anal. Acad. R.P.R., Seria științe medicale, 1950, t. II, mem. 36, p. 1400.
24. Menkes B. și Brătianu C., *Cercetări experimentale asupra rahiomieloschisisului*, Bul. științ. Acad. R.P.R., Seria: științe medicale, 1950, t. II, nr. 9, p. 1093.
25. Menkes B. și Rîmniceanu C., *Intervenții microchirurgicale asupra sistemului nervos central la embrionul de găină (Distrugerea veziculelor cerebrale și ale cupei optice. Tehnica intervențiilor și rezultatelor obținute)*, Bul. științ. Acad. R.P.R., Secțiunea de științe medicale, 1953, t. V, nr. 2, p. 237.
26. Mîrza V. D. și Menkes B., *Evoluția funcțională a sistemului nervos. Dezvoltarea penelor și a pigmentului analizate prin heterogrefe embrionare interspecifice*, Bul. științ. Acad. R.P.R., Secțiunea de științe medicale, 1951, t. III, nr. 2, p. 313.

27. Mîrza V. D., Rîmniceanu C., Miclea C., Lungulescu M. și Litvac B., *Interrelații dintre vitelus și embrionul de găină. Fosfataza alcalină și reacția Feulgen în ontogeneza embrionului de găină*, Bul. științ. Acad. R.P.R., Secțiunea de științe medicale, 1952, t. IV, nr. 4, p. 845.
28. Nawar G., *Experimental Analysis of the Origin of the Anatomic Ganglia in the Chick Embryo*, J. of Exper. Zool., vol. 110, 1950, nr. 3, p. 35.
29. Parhon C. I. și Laurian L., *Încercări de dirijare a embriogenezei. Nota II. Cauterizarea ochiului în cursul dezvoltării embrionare la găină*, Bul. științ. Acad. R.P.R., Secțiunea științe medicale, 1953, t. V, nr. 1, p. 5.
30. Preda V. și Cristea N., *Rolul trofic al sistemului nervos embrionar. Nota I. Rolul sistemului nervos central în dezvoltarea condriomului hepatic embrionar*, Comunicările Acad. R.P.R., 1956, t. VI, nr. 6, p. 849.
31. Repciuc E. și Andronescu A., *Apariția primelor vase sanguine în interiorul tubului neural la găină și la animale mamifere*, Bul. științ. Acad. R.P.R., Secțiunea de științe medicale, 1954, t. VI, nr. 4, p. 1023.
32. Sepp E. K., *Istoria razvitia nervnoi sistemî pozvonocinîh ot bescerepnîh do celoveke*, Moscova, Medghiz, 1949, p. 421.
33. Severțov A. N., *Proishojdenie i evoluția konecinostei*, Izd. Akad. Nauk SSSR, Moscova-Leningrad, 1950.
34. Strudel G., *Conséquences de l'excission de Troncons du tube nerveux sur la morphogénèse de l'embryon de poulet et sur la différentiation de ses organes : Contribution à la genèse de l'ortosympathique*. Ann. de Sc. Nat. Zool., 1953, t. 15, p. 251.
35. Șmidt G. A., *Embriologhiia jivotnih*, vol. I, Sovetskaia nauka, 1951.
36. Tchachotina S., *Die mikroskopische Strahlenstichmethode, eine Zelloperationsmethode*, Biol. Zentrale, t. 32, 1912.
37. Volohov S. A., *Zakonomernosti ontogheneza nervnoi deiatelnosti v svete evoluționnogo uceniia*, Moscova-Leningrad, Ed. Akad. Nauk SSSR, 1951, p. 312.
38. Waelsch L., *Über experimentell erzeugte Epithelwucherungen und Vervielfachung des Medullarrohres bei Hühnerembryonen*, Arch. f. Entw. Gesch., 1914, nr. 38, Alfr. Fischel, p. 25.
39. Watterson R. L., Fowler L. a. Fowler B. I., *The Role of the Neural Tube and Note Chord in Development of the Chick*, Am. J. of Anat., 1954, vol. 95, nr. 3, p. 337.
40. Weiss P., *Entwicklungsphysiologie der Tiere*, 1930, Leipzig, Theodor Steinknopf.
41. Wenger-Lerner E. L., *An Experimental Analysis of Relation between Parts of the Brachial Spinal Cord of the Embryonic Chick*, J. Exp. Zool., 1950, vol. 114, nr. 1, p. 51.
42. Wolff E., *Les bases de la tératogénèse expérimentale des vertébrés amniotes, d'après les résultats de méthodes directes*, Arch. d'anat. d'histol. et d'embriol., 1936, t. XXII.

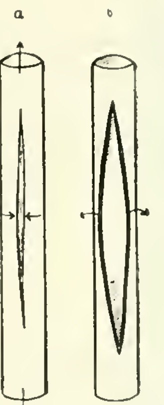


Fig. 212. — Schema acţiunii forţelor de tracţiune. *a*—Longitudinală şi *b*—transversală asupra tubului neural. Modelul: tubul de cauciuc incizat. Incizia tinde să se închidă în, *a* devine beantă în *b*.

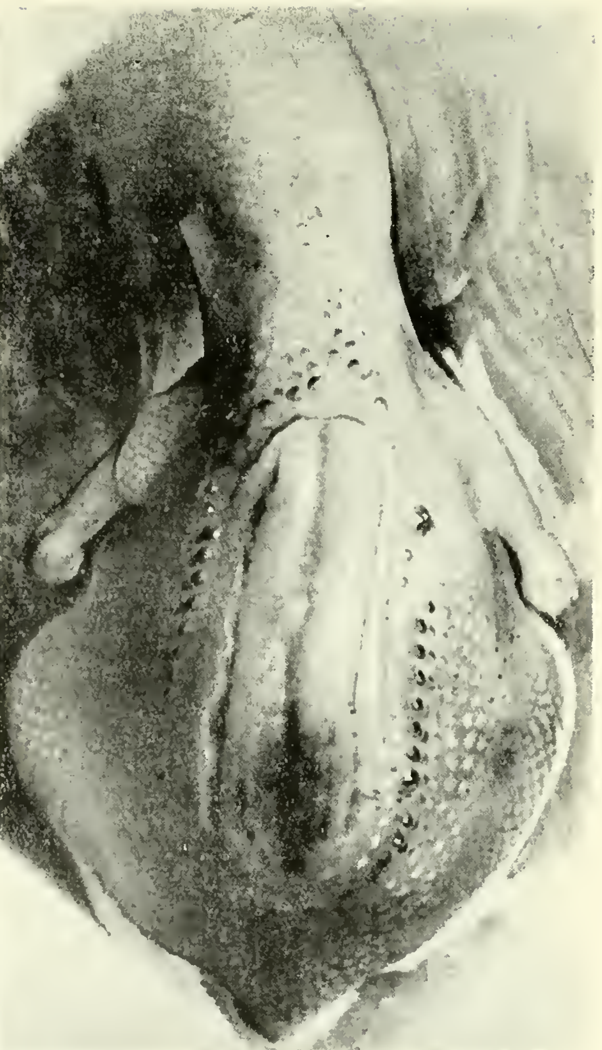


Fig. 213. — Embrion de găină de 9 zile de incubaţie. Mieloschizis experimental, la 6 zile după intervenţie. Placa neurală deschisă.

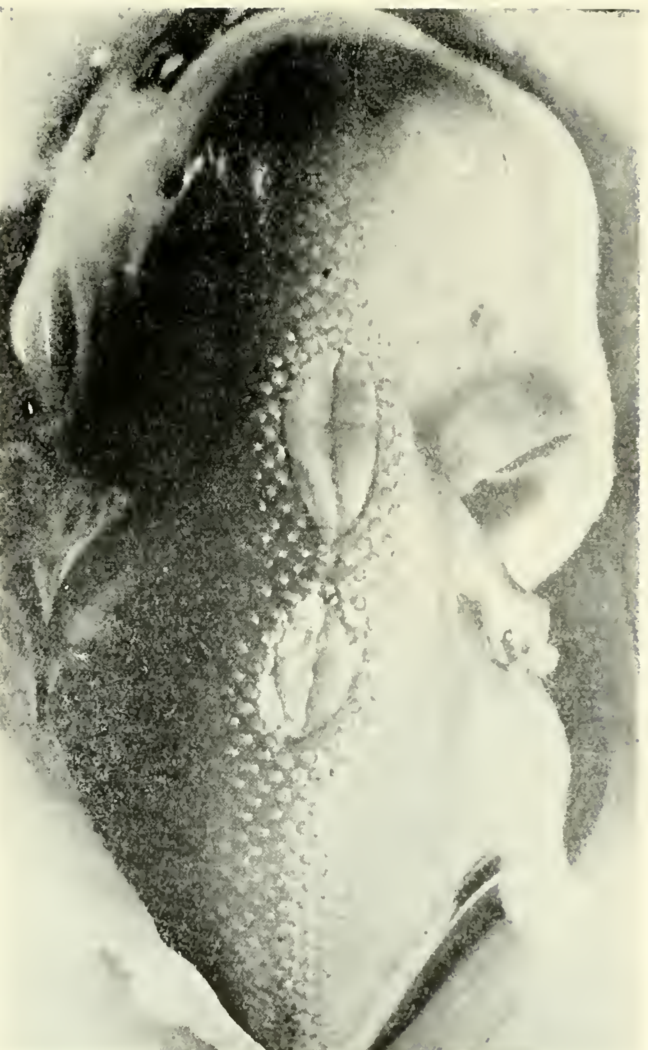


Fig. 214. — Embrion de găină de 9 zile de incubaţie. Tubul neural deschis în două locuri, la 6 zile după intervenţie.

Fig. 215. — Embrion de găină la 18 zile de incubație. Mieloschizis experimental din a treia zi de incubație. Exteriorizare a măduvei dorso-lombare.



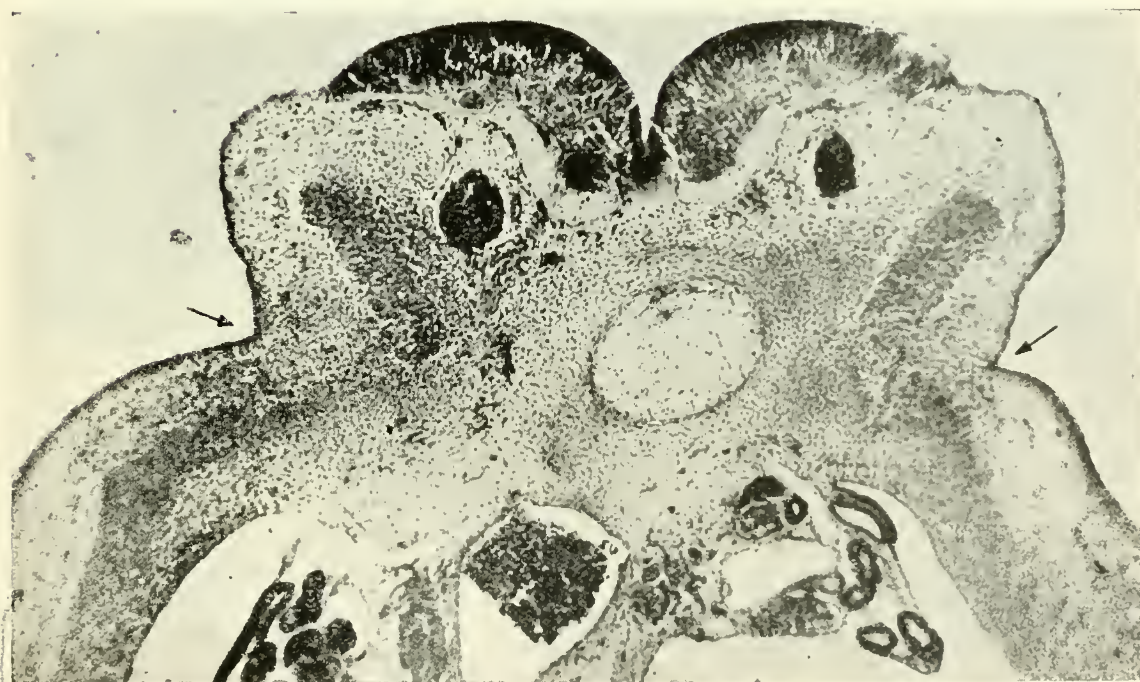


Fig. 216. — Mieloschizis la 3 zile după operație (în a cincea zi de incubație). Placa neurală întinsă. Ependimul se continuă cu epiteliul tegumentar. Ganglionii rahidieni împinși sub placa neurală. Somitele răsfrînte lateral. Banda mezenchimatoasă între placa neurală și sclerotom. La (↓) partea dorsală a trunchiului despărțită de cea anterolaterală de un șanț, rezultatul întinderii plăcii neurale.



Fig. 217. — Embrionul din figura 216. Vedere de ansamblu a secţiunii.



Fig. 218. — *a* — Mieloschizis, la *3* zile după intervenție. Regiune cervicală. Placa neurală întinsă. Banda mezenchimatoasă dintre placă și sclerotom. Deformarea somitelor. *b* — Mieloschizis, la *3* zile după intervenție. Placa neurală începe să se detașeze de suportul ei. Fenomene de demarcație a plăcii neurale.



Fig. 219. — Detaliu din figura 218 a. Mieloschizis la 3 zile după operaţie. Sanţul adînc de delimitare a părţii dorsale a trunchiului.



Fig. 220. — Mieloschizis la 5 zile după intervenţie. Deschidere incompletă a tubului neural.



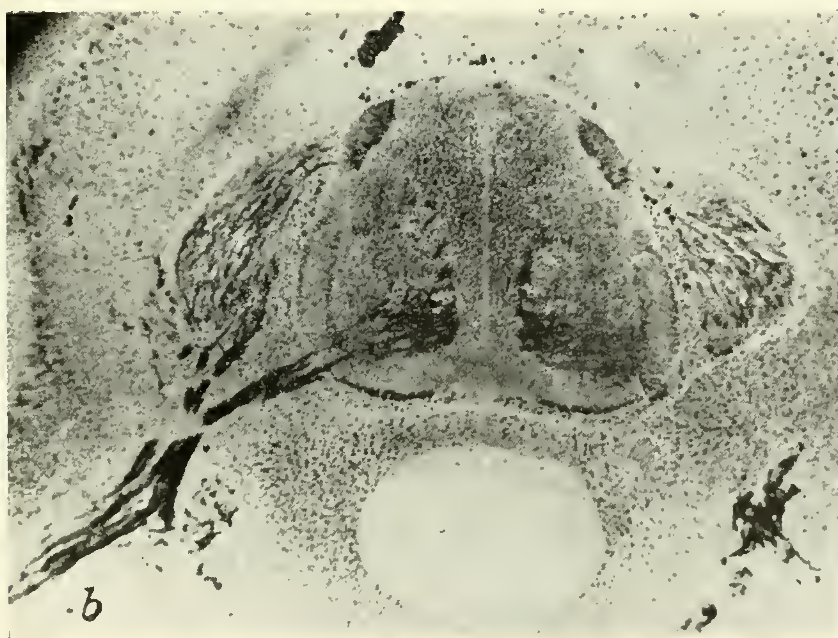


Fig. 221. — Comparaţie între raporturile normale ale tubului neural şi raporturile topografice cu organele învecinate în cazul mieloschizului experimental. *a* — Mieloschizis experimental. Se remarcă banda mezenchimatoasă care desparte placa neurală de sclerotom. Volum medular crescut. *b* — Martor normal (impregnaţie argentică).



Fig. 222. — Embrion de găină. Începutul celei de a treia zile de incubaţie. Secţiune transversală prin partea mijlocie a trunchiului. Tub neural; somitele; coarda; canalul Wolff; aorte; ectoderm; endoderm; celomul intra- şi extraembrionar; vase viteline; cutele amniotice laterale; membrana vitelină.



Fig. 223. — Embrion de găină la începutul celei de a treia zile de incubaţie. Secţiune transversală prin partea caudală a trunchiului. Legenda ca în figura 222.




Fig. 224. — *a* — Embrion de găină. *Spina bifida* spontană. Simpodie cu poziție „axială" a membrelor inferioare. *b* — Același caz; dedublarea canalului ependimar, distal de schizis.



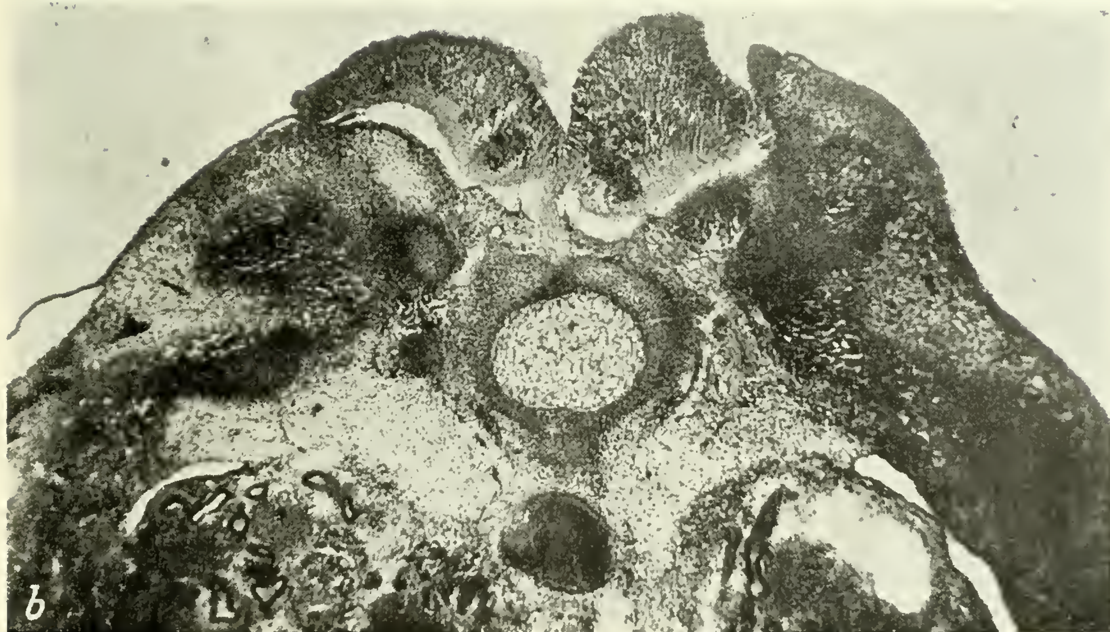


Fig. 225. — *a* — Vedere de ansamblu a secțiunii prin regiunea afectată în cazuri de mieloschizis (*spina bifida*) spontan la embrionul de găină. *b* — Detalii. Se văd un trunchi nervos anormal pe planul median și o deformare a corpului vertebral în legătură cu acest trunchi.

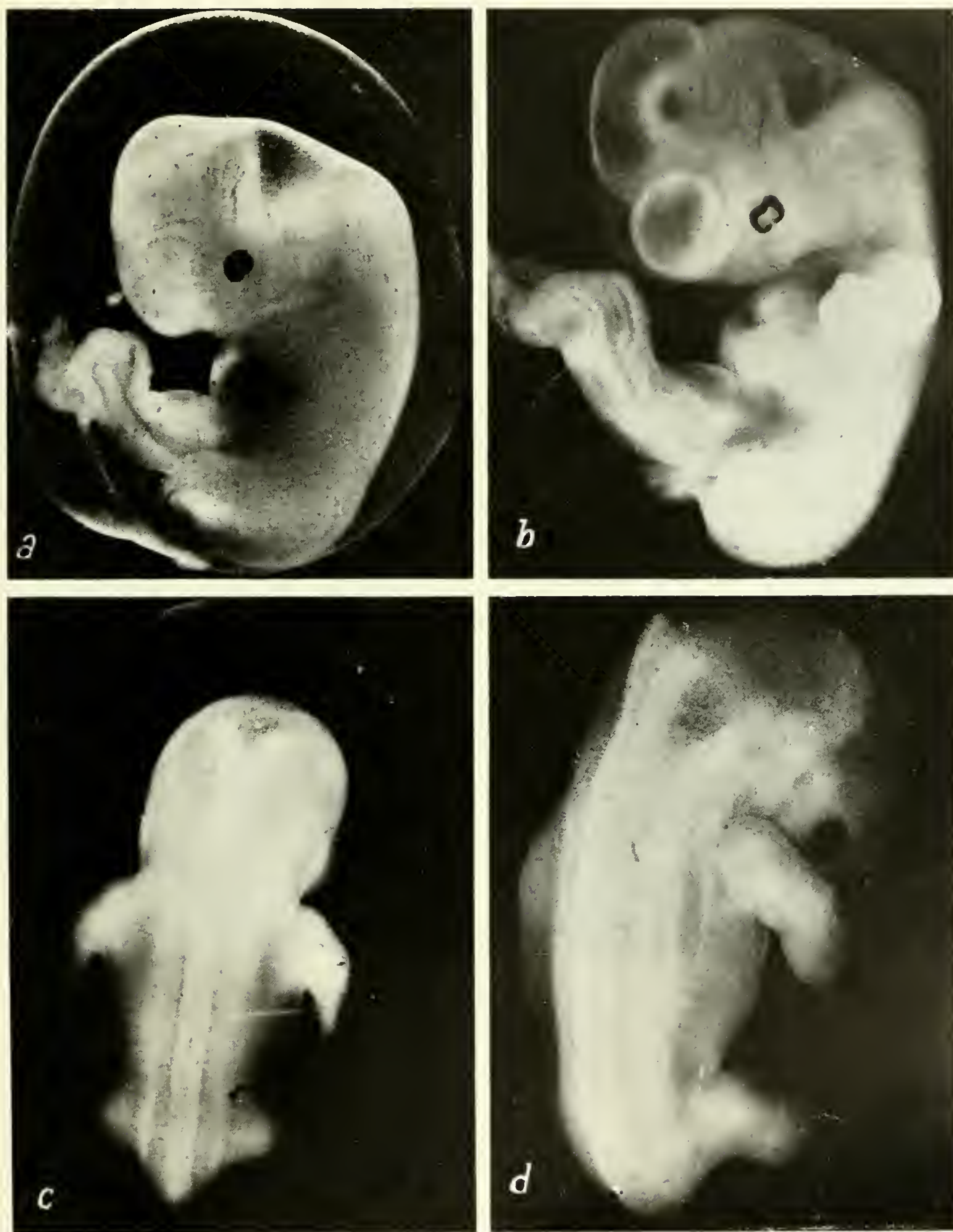


Fig. 226. — Embrion uman în a doua lună de sarcină, preparat proaspăt, nefixat. (*a* și *b*); *c* și *d* prezintă vederea posterioară a embrionului; se vede sutura dorsală a tubului neural, iar sus, rombencefalul cu tavanul său subțire.



Fig. 227. — Nou-născut cu spina bifidă lombo-sacrată.

Fig. 228. — Nou-născut. Craniorahischizis. Anencefalie. *a* — Vedere din spate şi *b* — vedere din faţă.

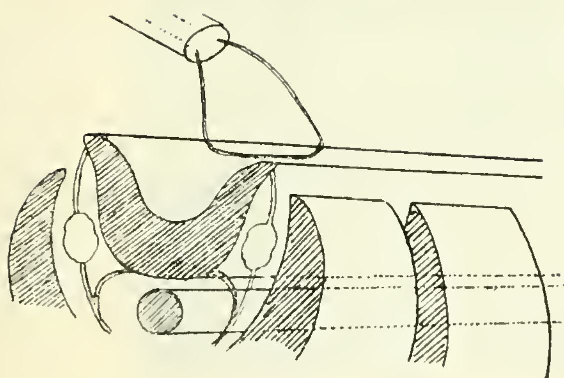


Fig. 229. — Schema operaţiei de termocoagulare a măduvei. Microcauterul introdus în tubul neural deschis.

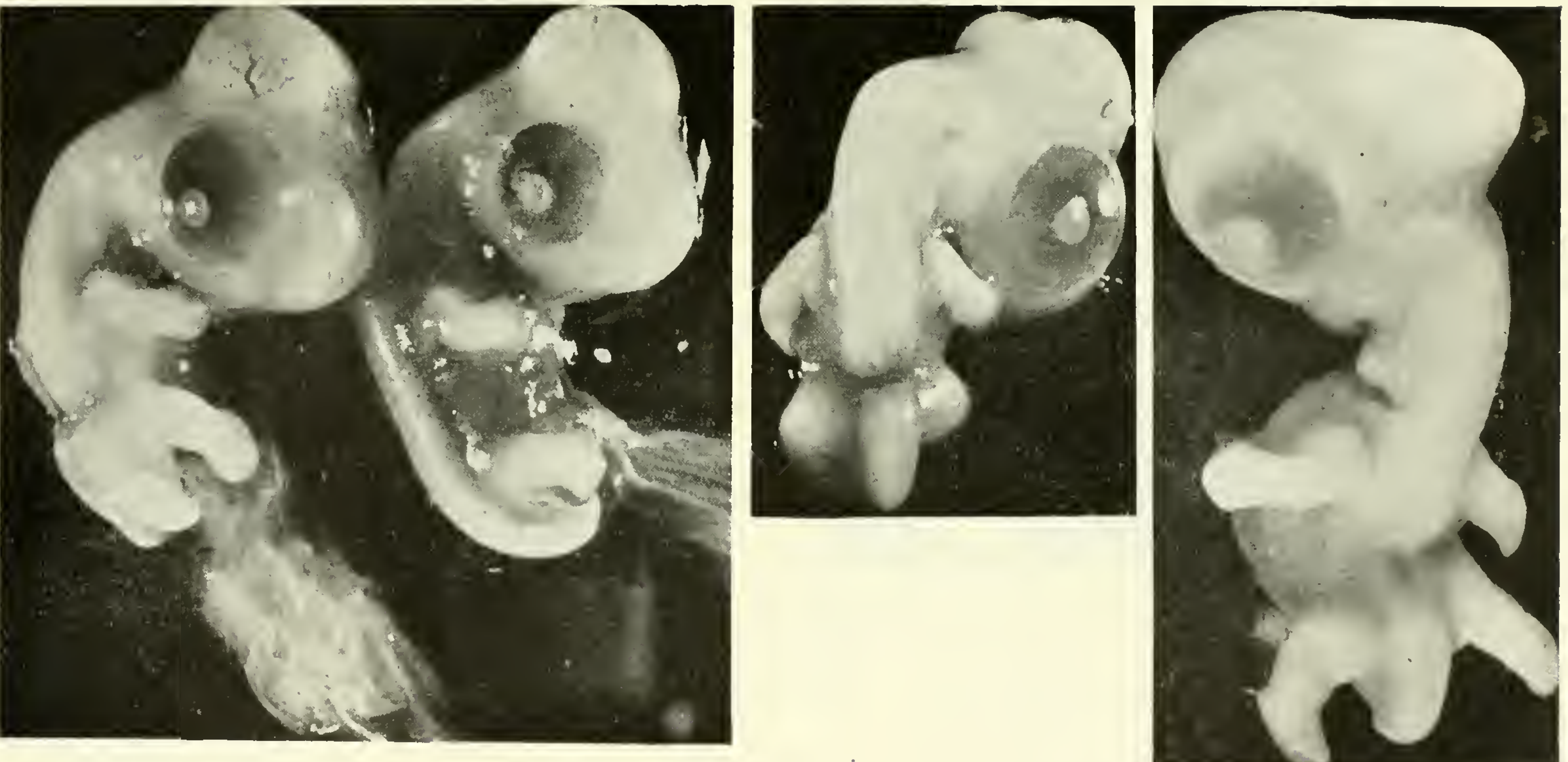


Fig. 230. — Embrion de 6 zile, la 3 zile după coagularea măduvei în dreptul membrelor inferioare. Se remarcă scurtarea distanței dintre membrele superioare și cele inferioare (prin îndoire, lordoză și contractare); alături, martorul normal.

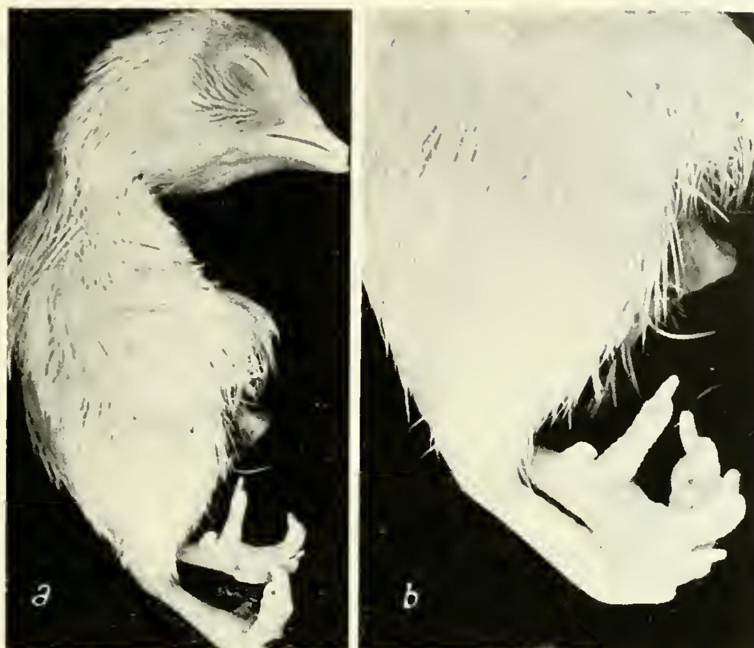


Fig. 231. — *a* şi *b* — Deformări care se instalează după a 12-a zi de incubaţie, la nivelul membrelor inferioare, la embrionii operaţi.

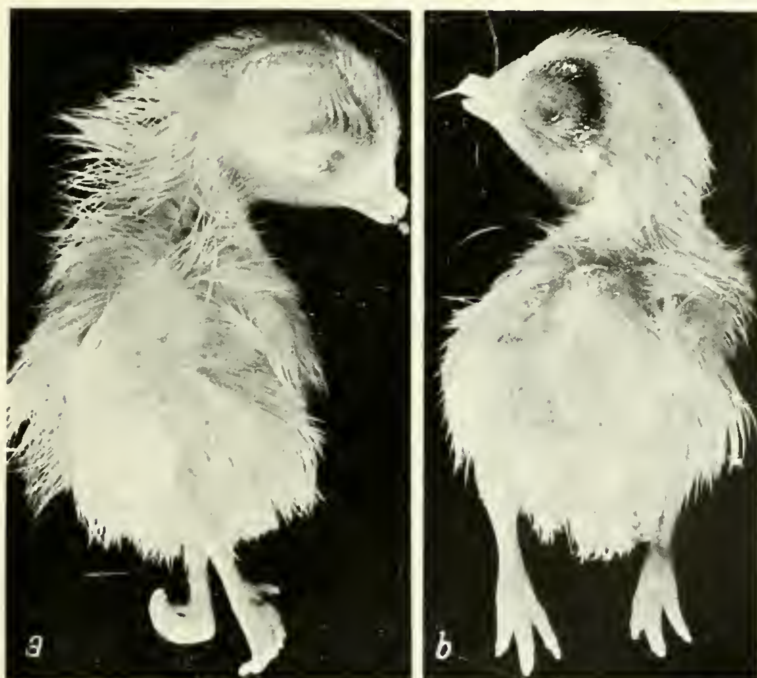
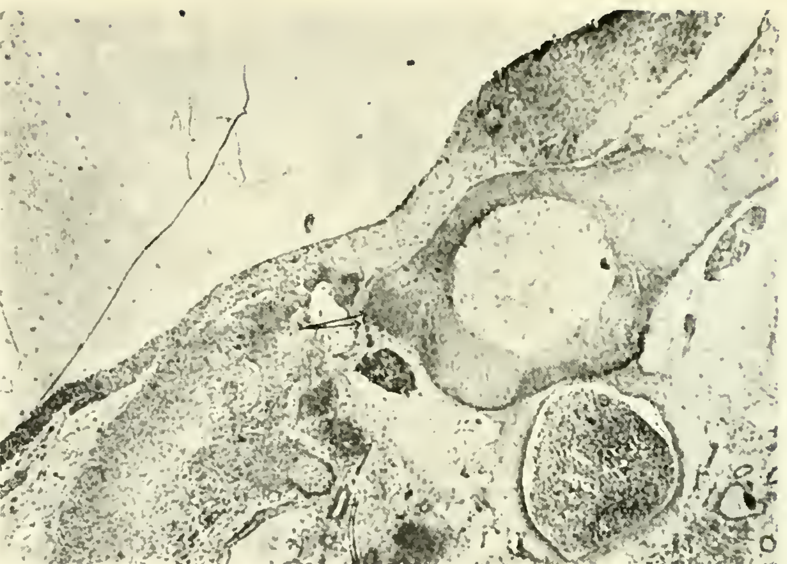
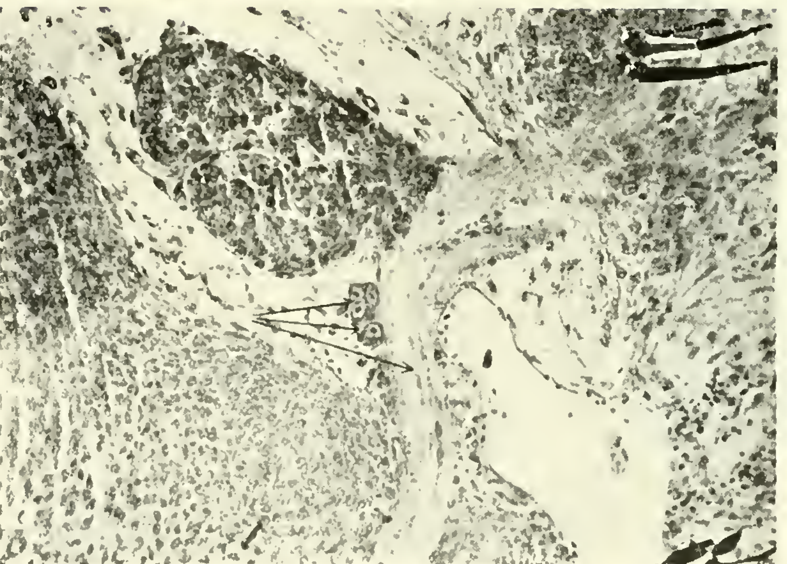


Fig. 232. — *a* — Embrion de 15 zile, căruia i s-a cauterizat măduva la nivelul membrelor inferioare la vîrsta de 3 zile. S-a instalat o poziţie vicioasă a membrelor, „în gheară". Lipsa mişcărilor normale la această vîrstă. *b* — Embrion de 16 zile, căruia i s-a cauterizat măduva la nivelul membrelor superioare. Membrele inferioare, normal dezvoltate, au prezentat mişcările normale pentru această vîrstă.





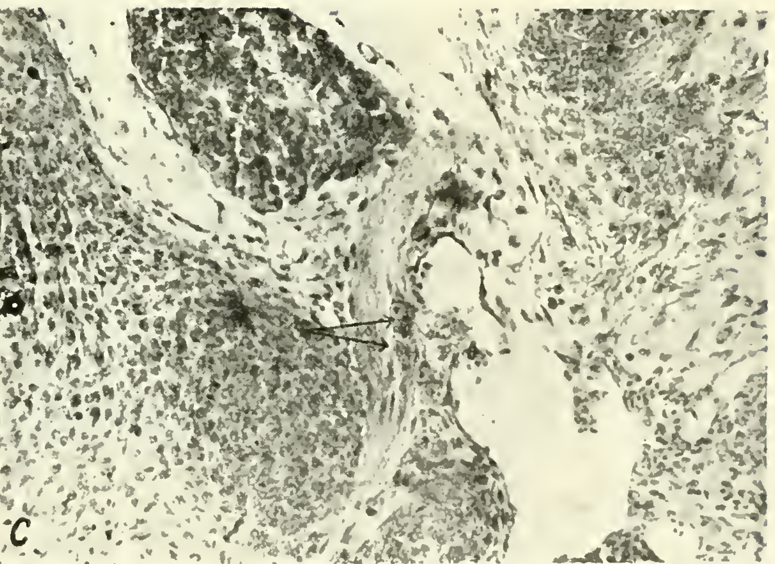
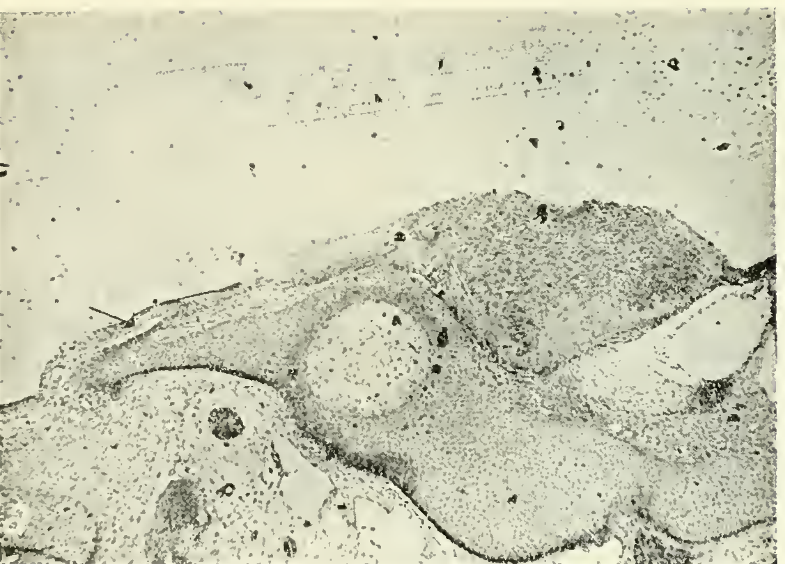
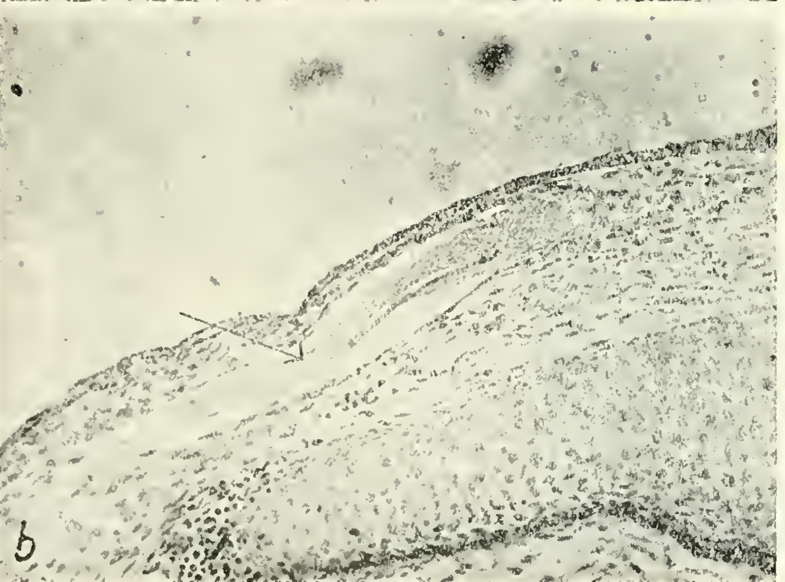


Fig. 233. — *a* — Hemicauterizarea măduvei la embrionul de găină. *b* și *c* — Neuroblaștii pe traiectul trunchiului neoformat. (↗/↗)



Fig. 234. — Hemicauterizarea măduvei (după mieloschizis).





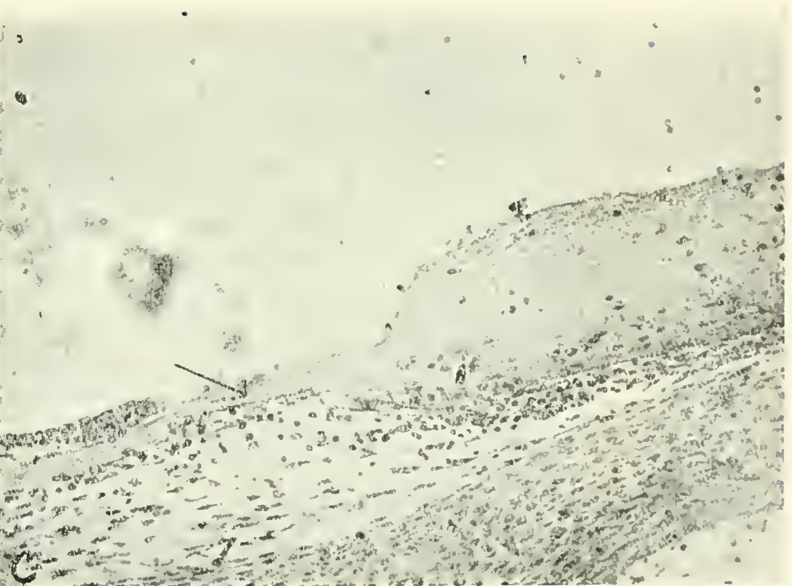


Fig. 235. — *a*, *b* și *c* — Hemicauterizarea măduvei (după mieloschizis) (↘) indică un trunchi nervos neoformat mergînd spre jumătatea lipsită de măduvă.

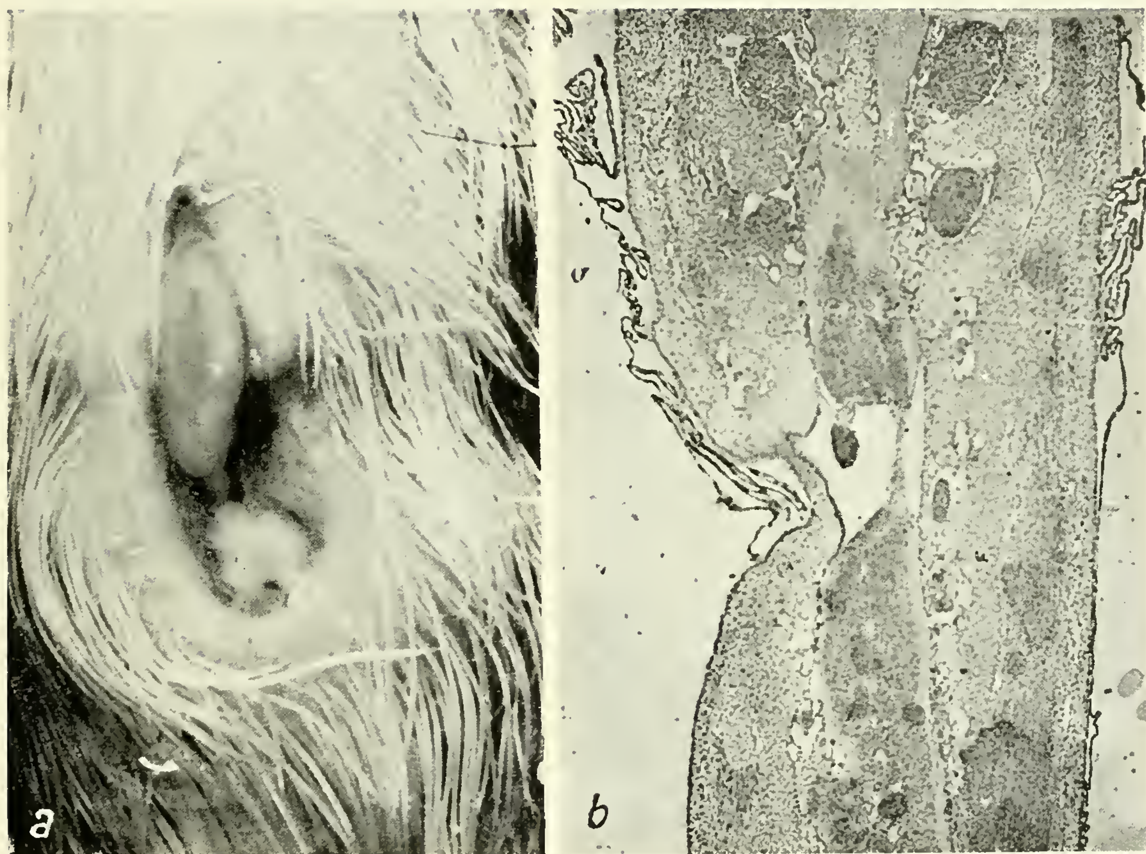


Fig. 236. — *a* — Embrion de 20 de zile cu mieloschizis experimental din a treia zi de incubație. Distrugerea măduvei prin termocauterizare în a patra zi de incubație. Se văd cele două capete ale măduvei, între care s-a format o punte de legătură. *b* — Secțiune longitudinală prin puntea de legătură la un embrion de 7 zile.

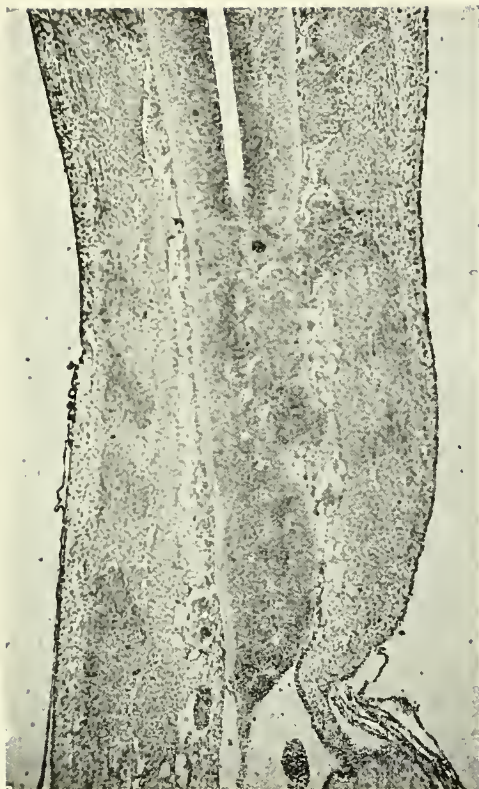
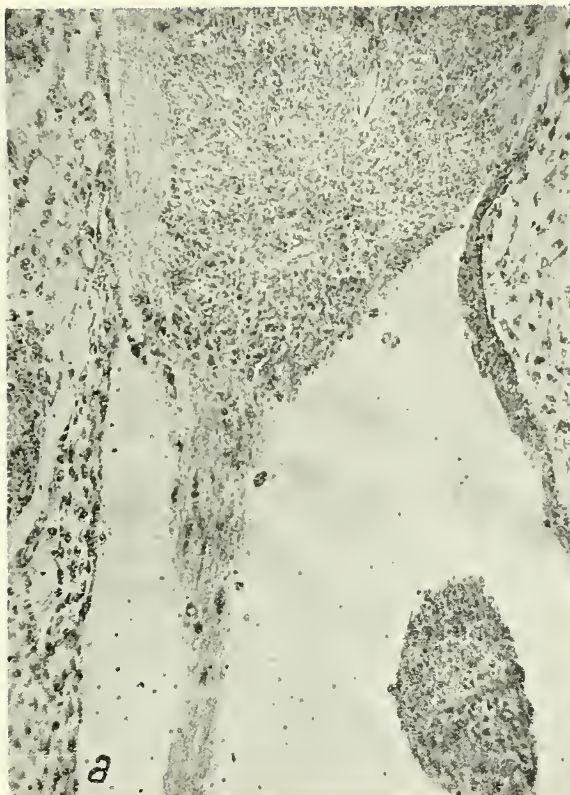


Fig. 237. — Embrion de 7 zile, cauterizat la 3 zile. Secțiune frontală-longitudinală a tubului neural. Tubul neural a fost distrus pe o lungime de circa 8 segmente. Se văd partea regenerată a tubului neural și defectul medular restant (în care canalul rahidian a rămas gol). S-a format o punte de legătură între cele două capete medulare, sub forma unui fascicul de fibre nervoase. În partea regenerată s-au format multiple canale epedimare (aspect teratoid). Se remarcă bogata vascularizație intra- și perimedulară în partea regenerată.



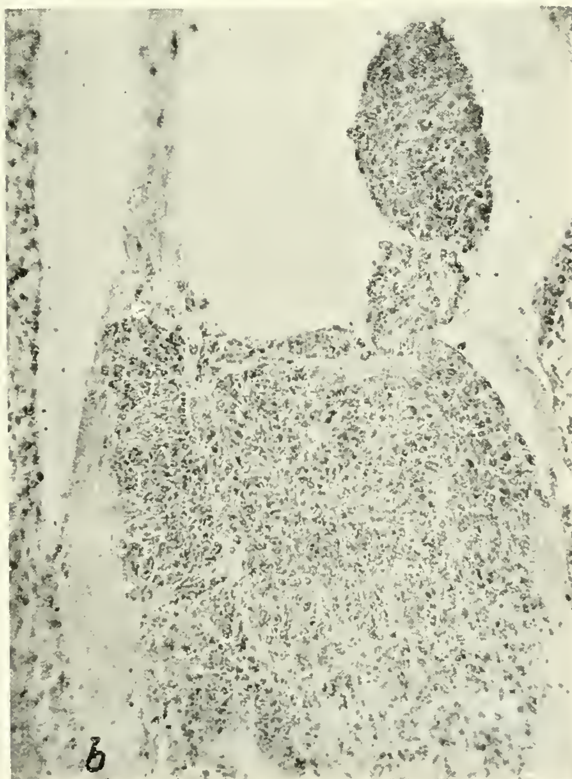


Fig. 238. — *a* și *b* — Detalii din figura 237. Se văd trunchiul de legătură în secțiune longitudinală și canalele ependimare neoformate.

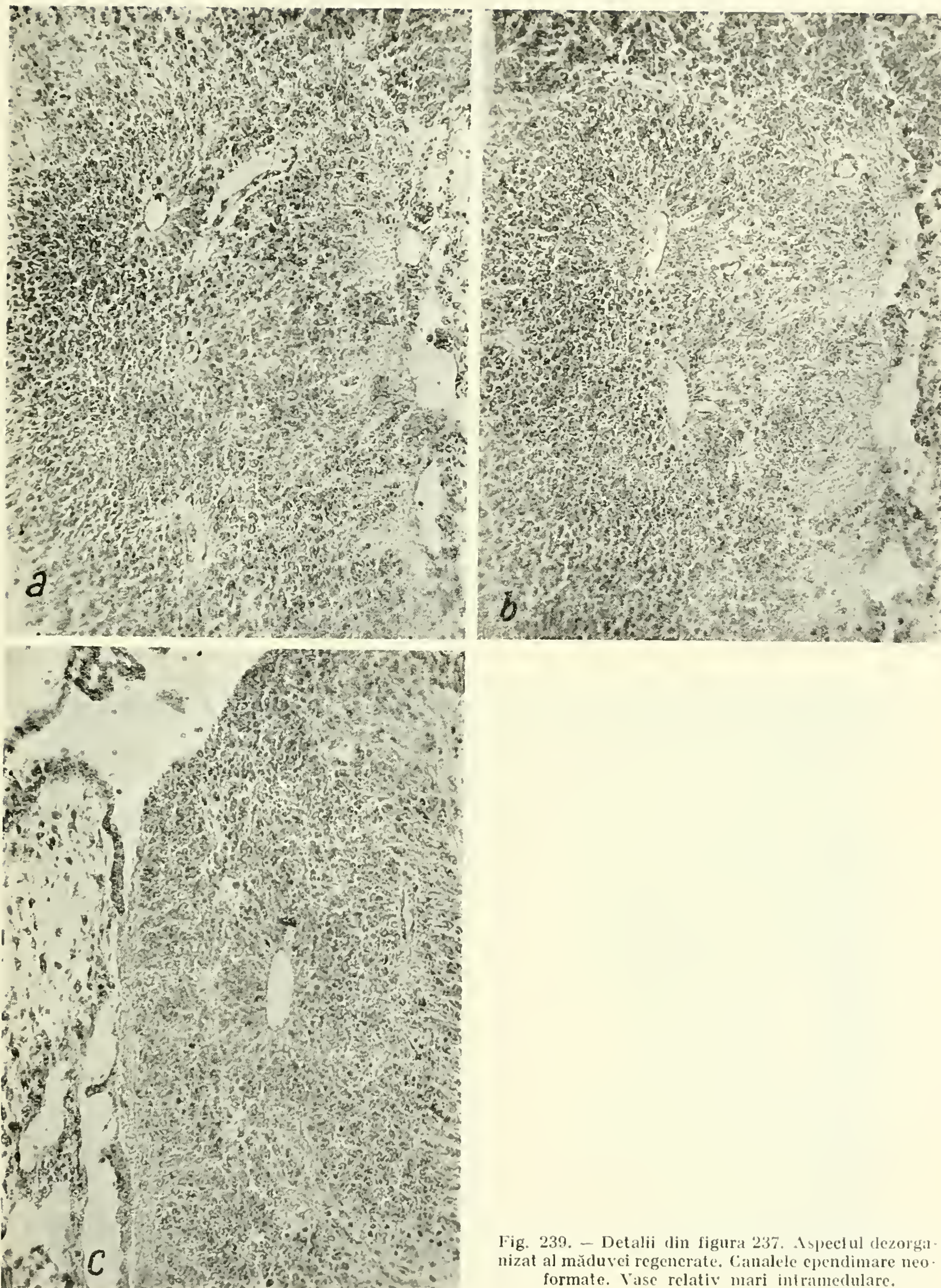


Fig. 239. — Detalii din figura 237. Aspectul dezorganizat al măduvei regenerate. Canalele ependimare neoformate. Vase relativ mari intramedulare.



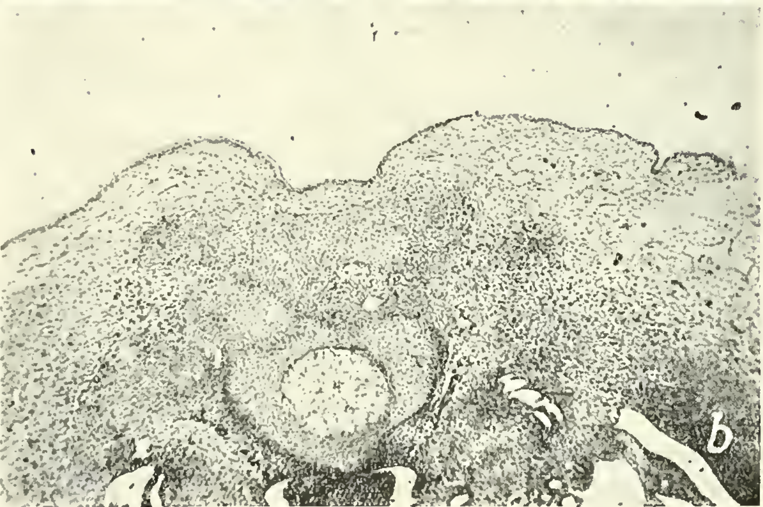
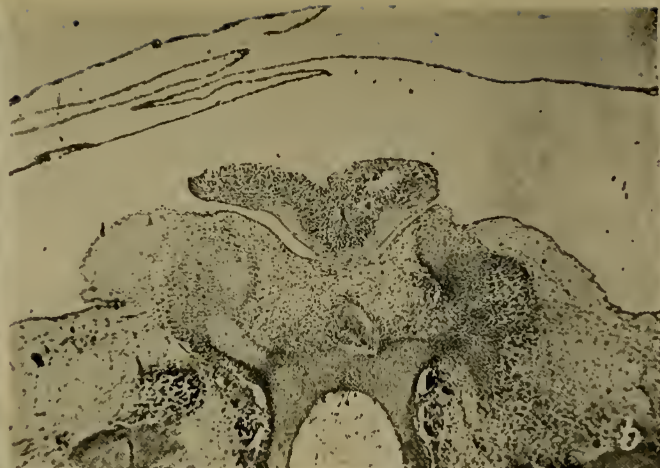


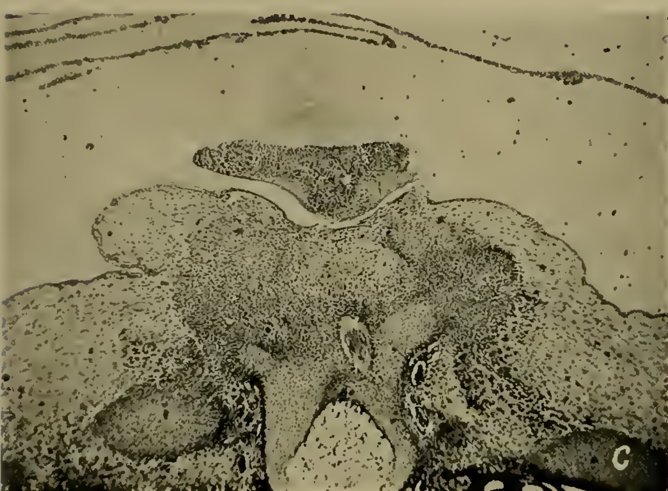
Fig. 240. — *a* — Ablaţia totală a măduvei (operaţie la 3 zile de incubaţie) la nivelul membrelor inferioare. Refacerea tegumentului. Intensă reacţie a fosfatazei alcaline (↓) *b*—Aspect anormal al rădăcinilor arcului vertebral. În locul măduvei, un ţesut lax mezenchimatos şi cîteva vase.

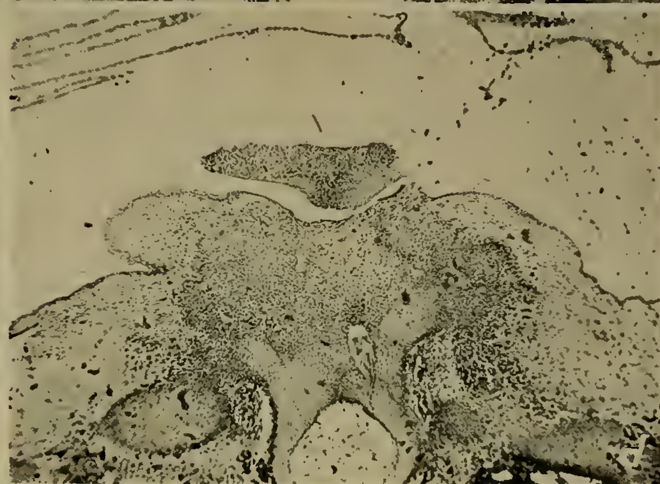


Fig. 241. — Aspect al măduvei în a doua perioadă (după 12 zile de incubaţie).









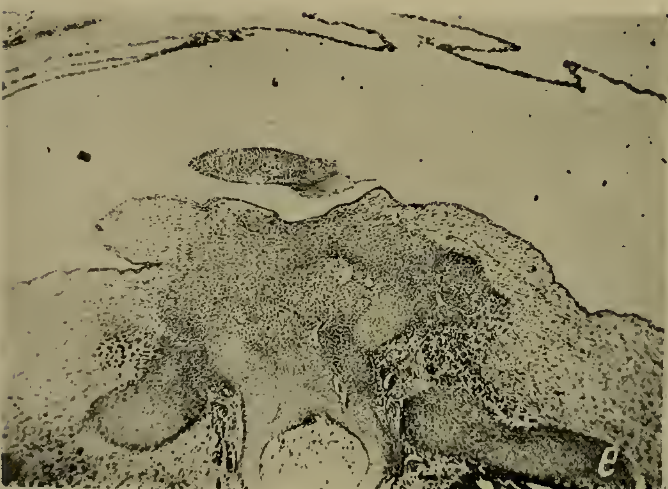




Fig. 242. — *a*, *b*, *c*, *d* şi *e* — Embrion cu mieloschizis în apropierea zonei electrocoagulate ; din măduvă se detaşează un trunchi nervos care traversează corpul vertebral la rădăcina arcului. *f* — Detalii. Trunchiul nervos în lumenul unui canal care străbate modelul cartilaginos al corpului vertebral.

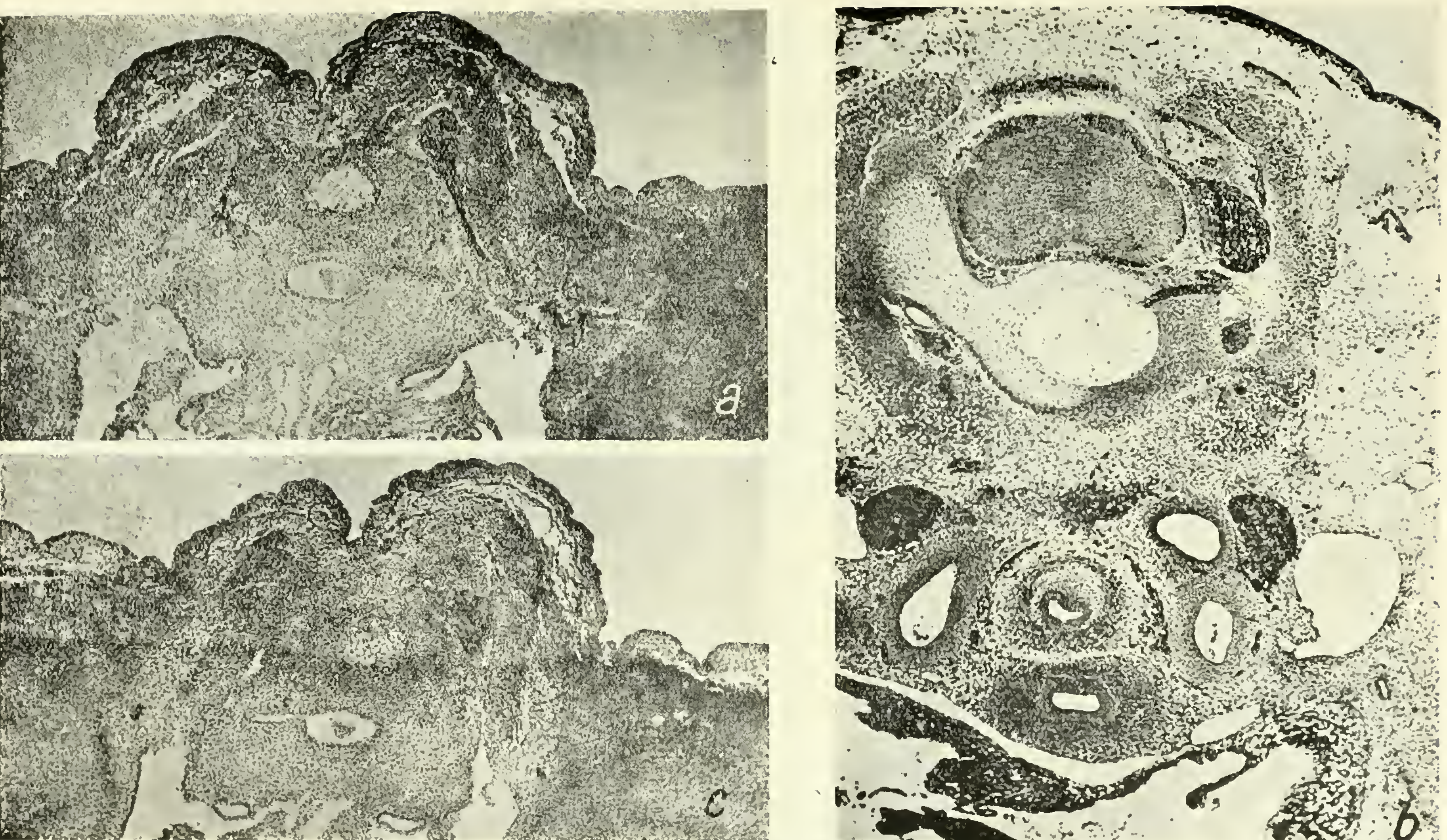


Fig. 243. — Embrion de 7 zile cu distrugerea completă a măduvei la nivelul membrelor inferioare, de-a lungul a 10 segmente. Secţiune transversală, impregnaţie argentică. Închidere a defectului tegumentar şi absenţa măduvei.

Se remarcă : — ganglionul rahidian izolat, care primeşte trunchiul său de fibre aferente. — În locul măduvei se găsesc cîteva trunchiuri nervoase — în secţiune transversală — care, îndreptîndu-se lateral, completează nervul rahidian, dîndu-i contingentul său motor.

a — Aşezarea tipică a rădăcinii anterioare. Regenerarea rădăcinilor anterioare, prin formarea unei „cozi de cal". *b* — Comparaţia cu o secţiune printr-un embrion normal. *c* — Doi ganglioni rahidieni rămaşi izolaţi.

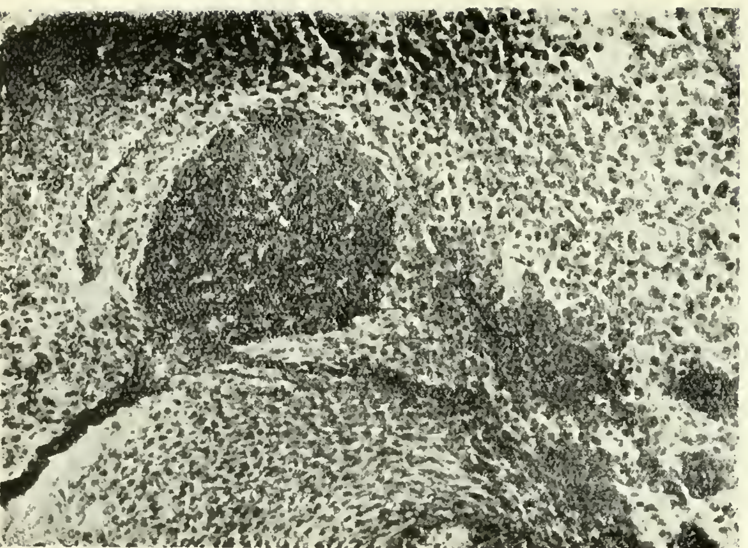


Fig. 244.—Detalii din figura 234. Se vede rădăcina anterioară regenerată.





Fig. 245. — *a* şi *b* — Dispoziţia topografică şi ramificaţia nervului rahidian în cazul embrionului din figura 243. Lipsa segmentului medular. Rădăcina anterioară regenerată.

58 – c. 1778





Fig. 246. — *a* — Dispoziția și grosimea nervului rahidian normal. *b* — Nervul „rahidian" al embrionului operat.

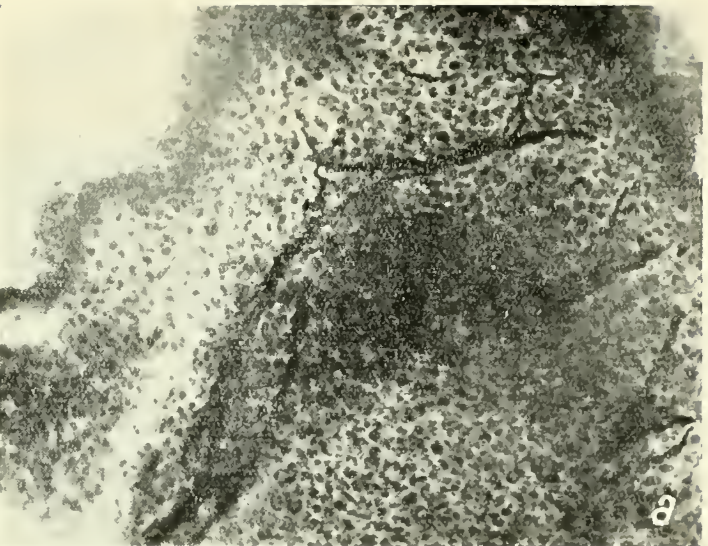




Fig. 247. — *a* și *b* — Plexuri nervoase dintr-un membru aparținînd regiunii operate.

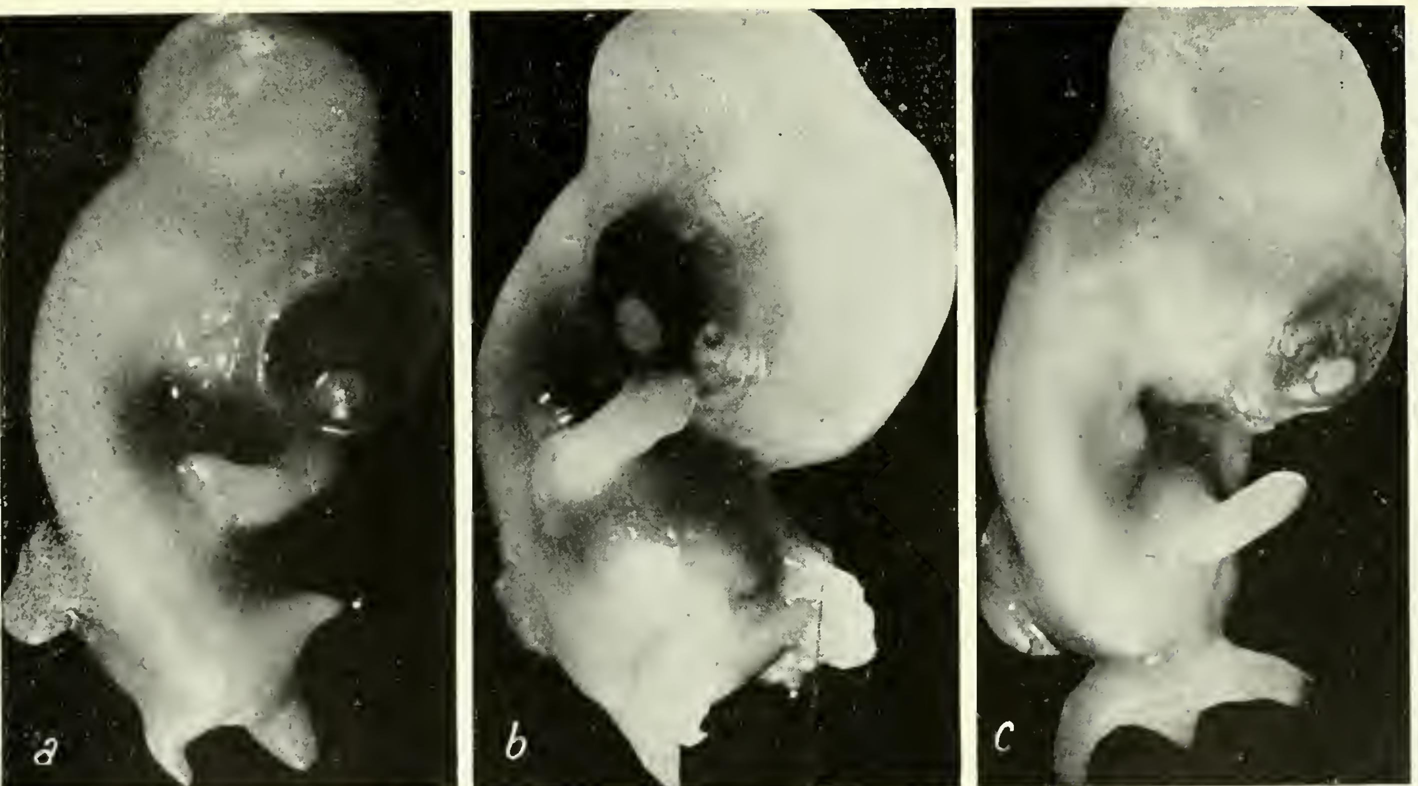


Fig. 248. — *a*, *b* şi *c* — Embrion de 6 zile. Cauterizarea măduvei la nivelul membrelor inferioare la vîrsta de 3 zile. Membrele inferioare malformate, cu aspect conic.

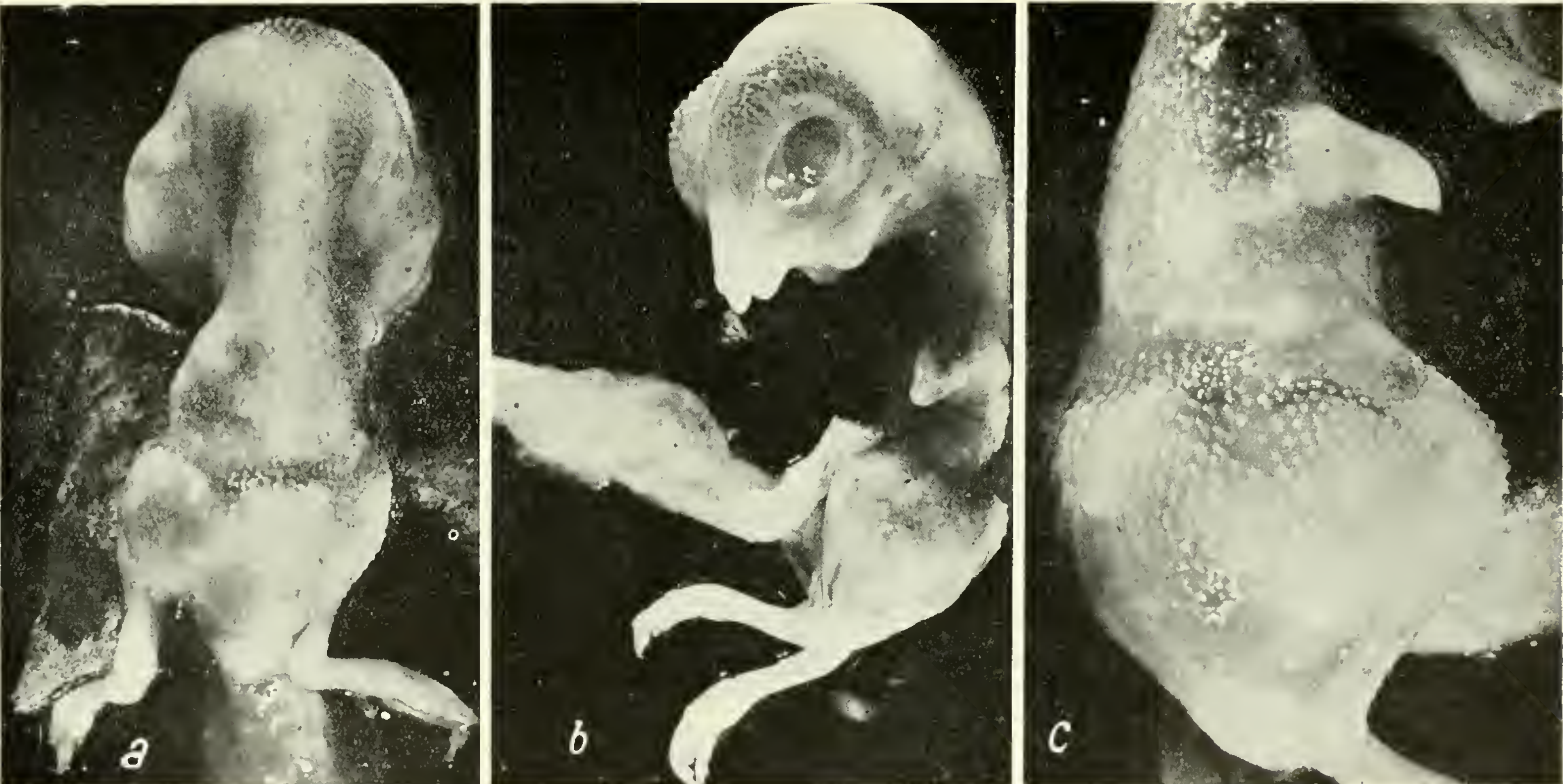


Fig. 249. — Embrion de 11 zile, căruia i s-a cauterizat măduva la nivelul membrelor superioare. Aspect conic al membrului superior. *a* — Vedere dorsală. *b* — Vedere laterală. *c* — Detalii.

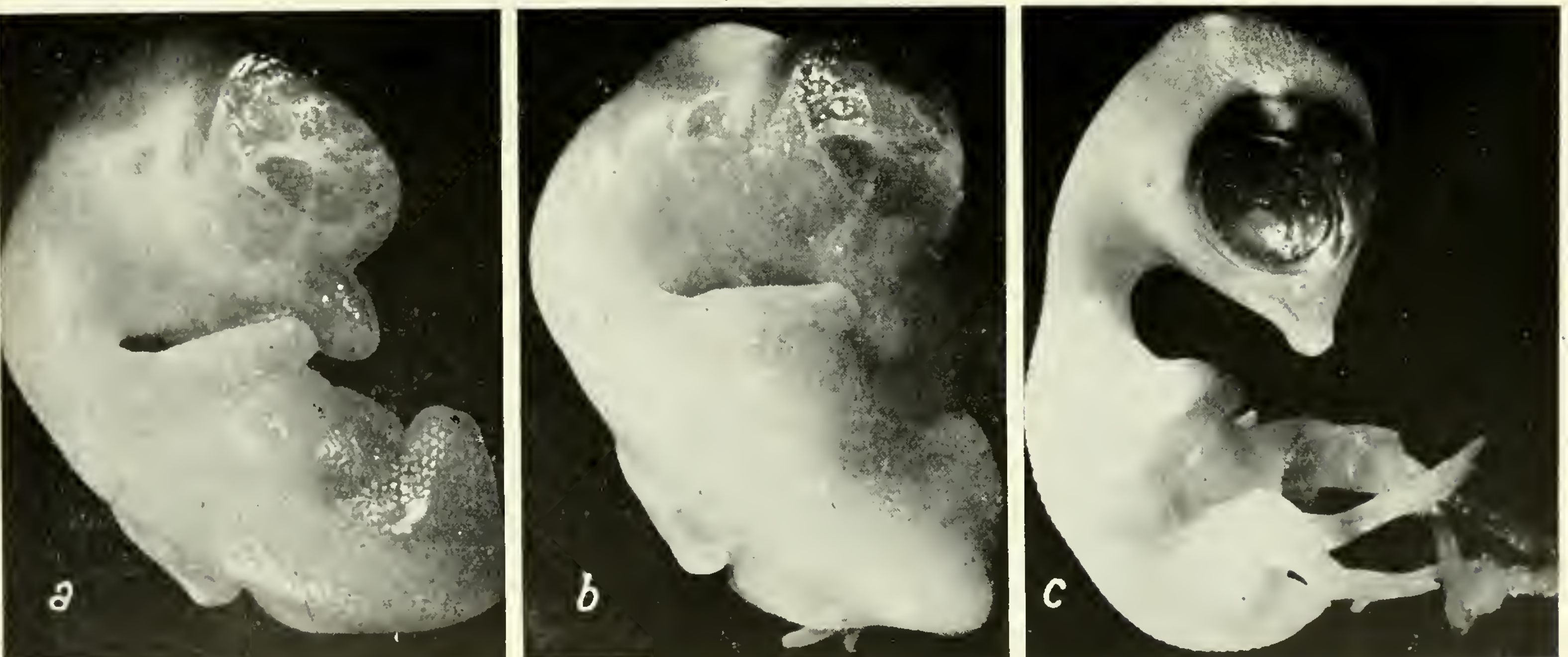


Fig. 250. — *a* și *b* — Embrion de 10 zile căruia i s-a cauterizat la 3 zile măduva, la nivelul membrelor inferioare. Rana tegumentară vindecată complet. S-a produs însă un defect al peretelui antero-lateral drept, la nivelul corpului Wolff. *c* — Același embrion, vedere laterală. Defectul peretelui antero-lateral al trunchiului prin care apare corpul Wolff. Membrele inferioare normal dezvoltate.

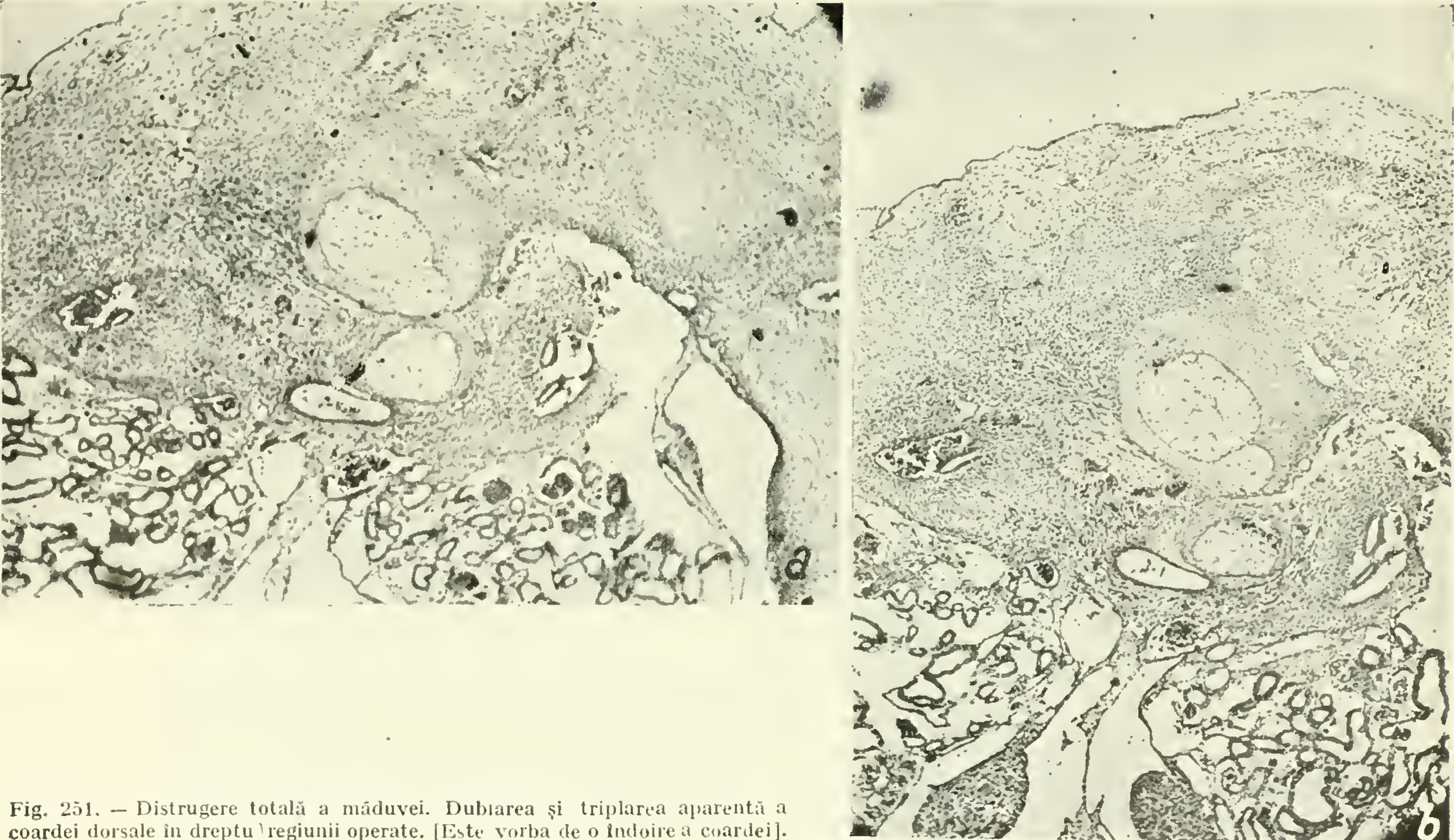


Fig. 251. — Distrugere totală a măduvei. Dublarea şi triplarea aparentă a coardei dorsale în dreptul regiunii operate. [Este vorba de o îndoire a coardei].



Fig. 252. — Embrion de 7 zile. Anencefalie experimentală. *a, b* — Electrocoagulare a veziculelor cerebrale la 51 de ore de incubaţie. S-a evidenţiat fosfataza alcalină. Reacţia fosfatazei este de intensitate maximă la nivelul bulbului (*a*) şi a măduvei (*b*). Embrion martor (*c*) de aceeaşi vîrstă, la care s-a evidenţiat fosfataza alcalină. Reacţia fosfatazei este slabă la nivelul măduvei, negativă la nivelul bulbului, maximă la nivelul diencefalului.

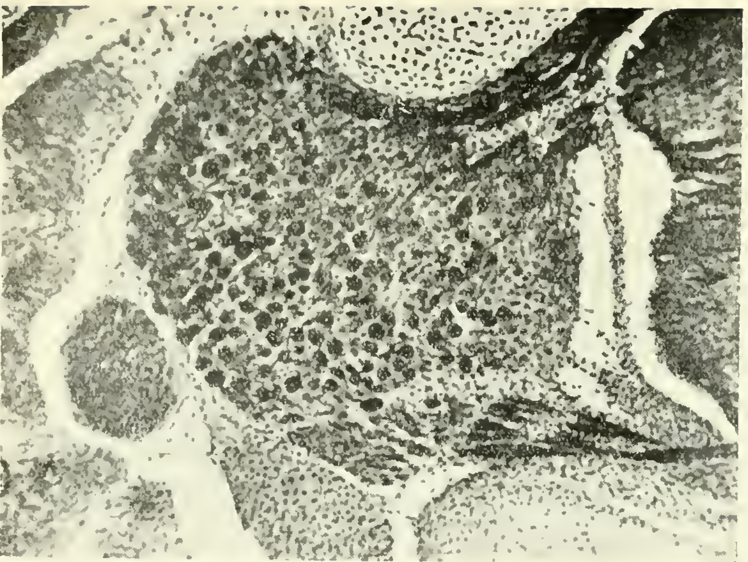
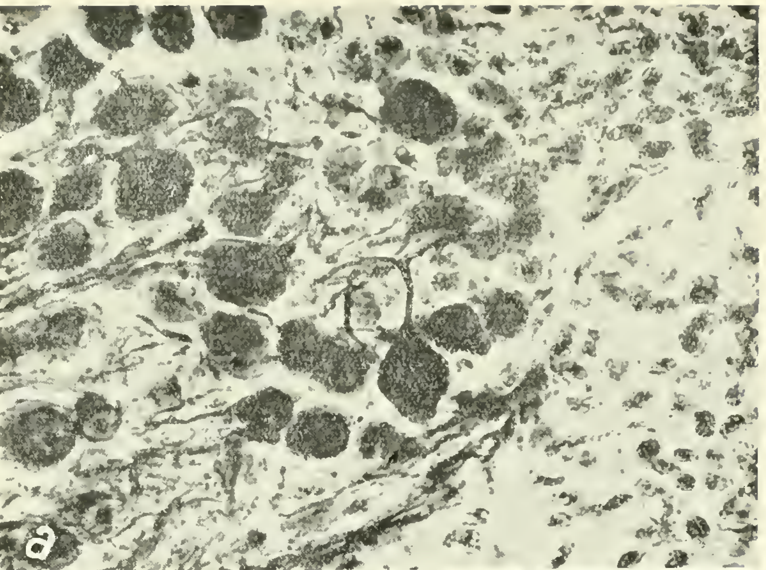


Fig. 253. — Embrion de găină de 12 zile de incubaţie. Ganglion rahidian. Impregnaţie argentică. Diferenţierea celulelor ganglionare mari.



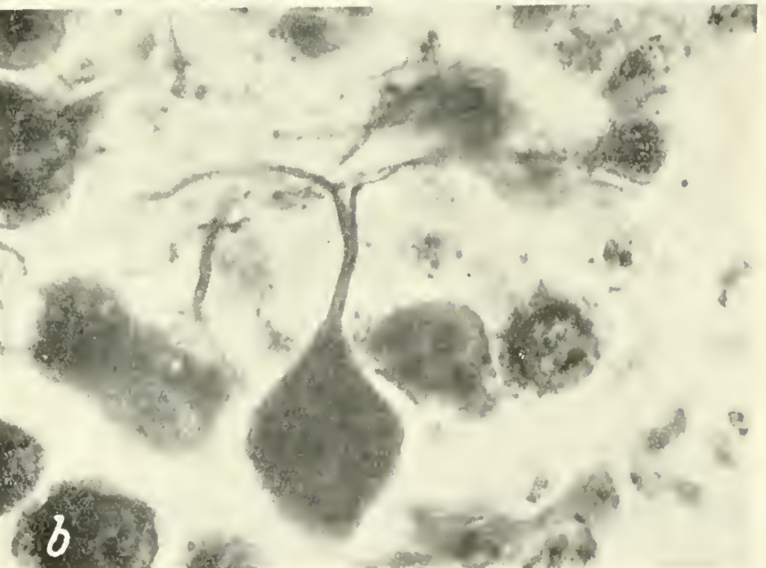
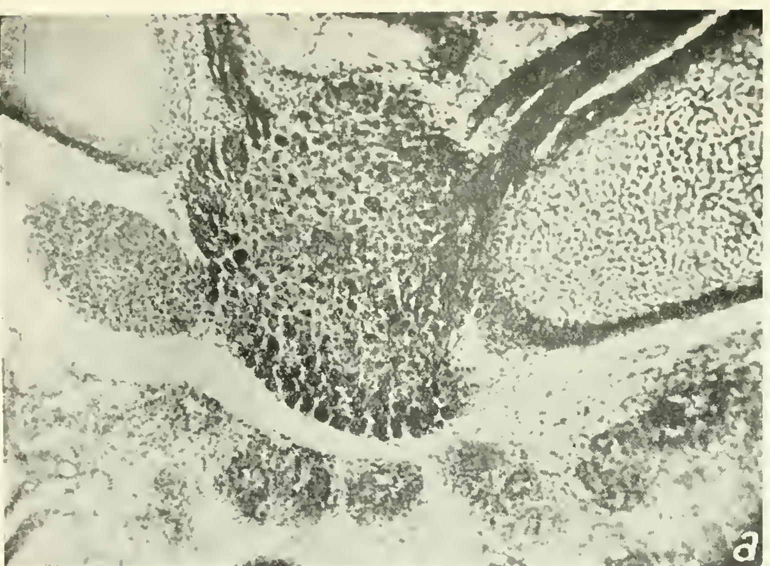
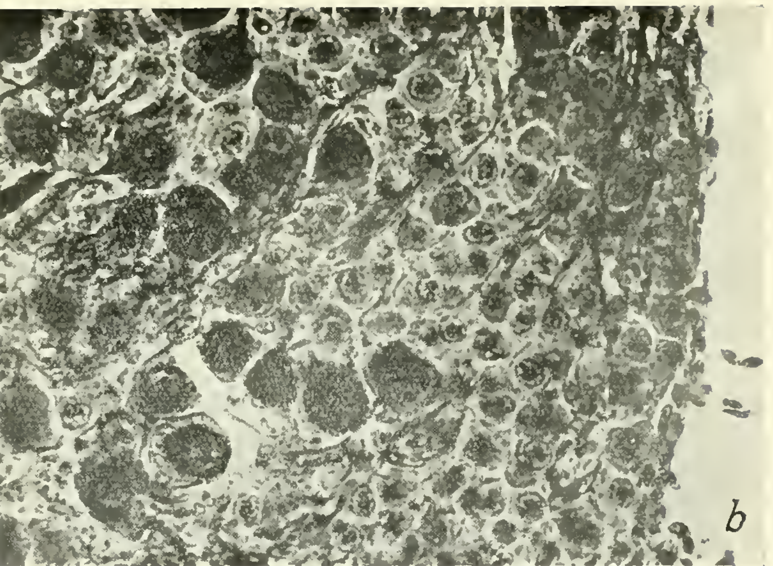


Fig. 254. — *a* şi *b* — Embrion de găină de 12 zile de incubaţie. Apariţia tipului ganglionar unipolar.





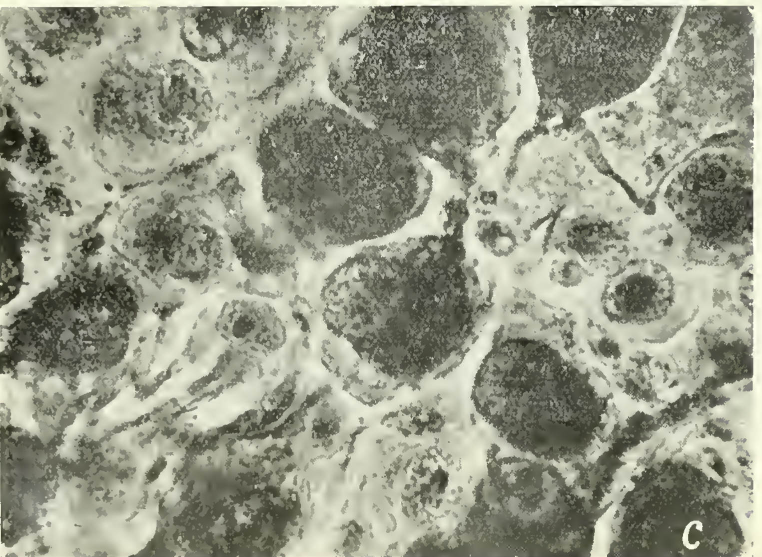


Fig. 255. — *a*, *b* și *c* — Embrion de găină de 12 zile de incubație. Diferențierea celulelor ganglionare mari. Impregnație argentică.

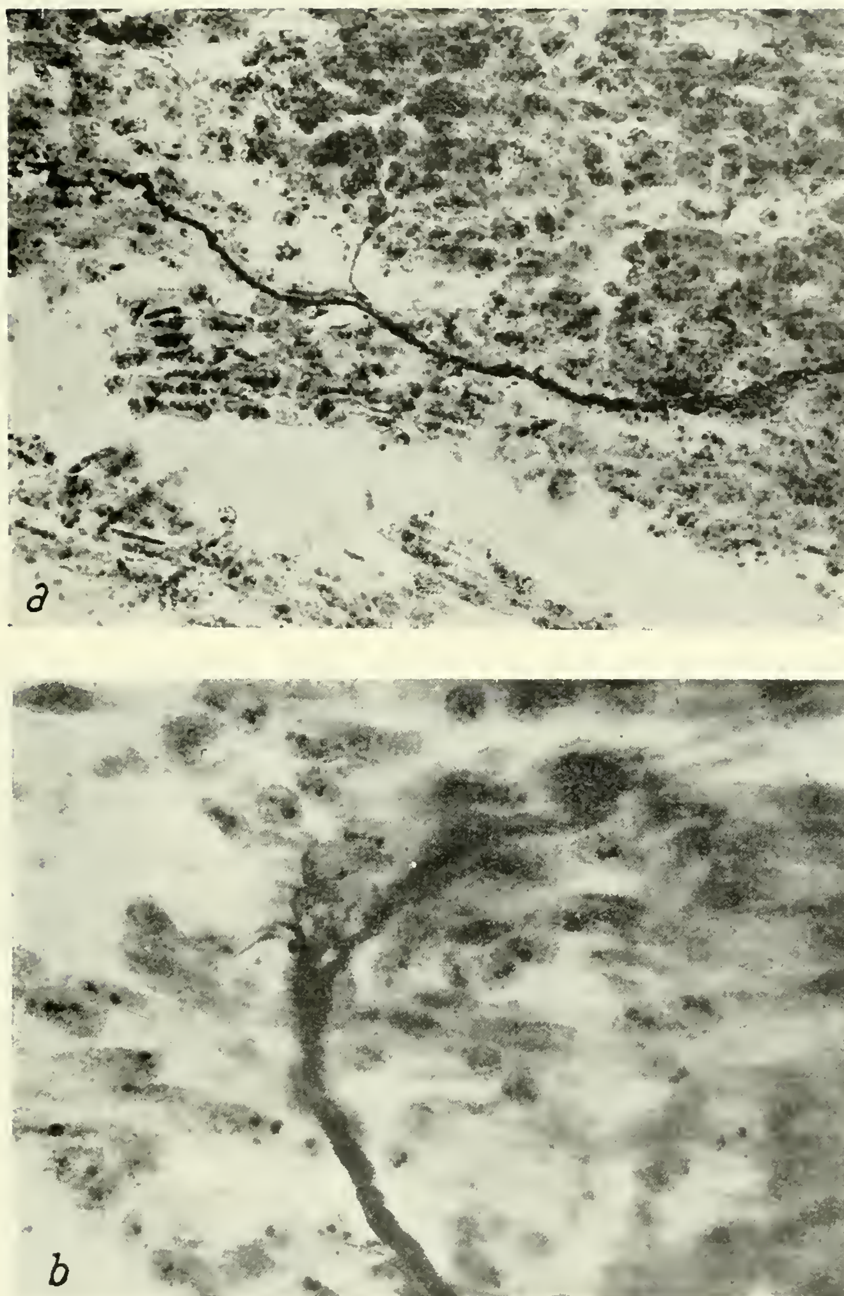


Fig. 256. — *a* și *b*. — Embrion de găină de 12 zile incubație. Impregnație argentică. Terminații nervoase motoare în musculatură.

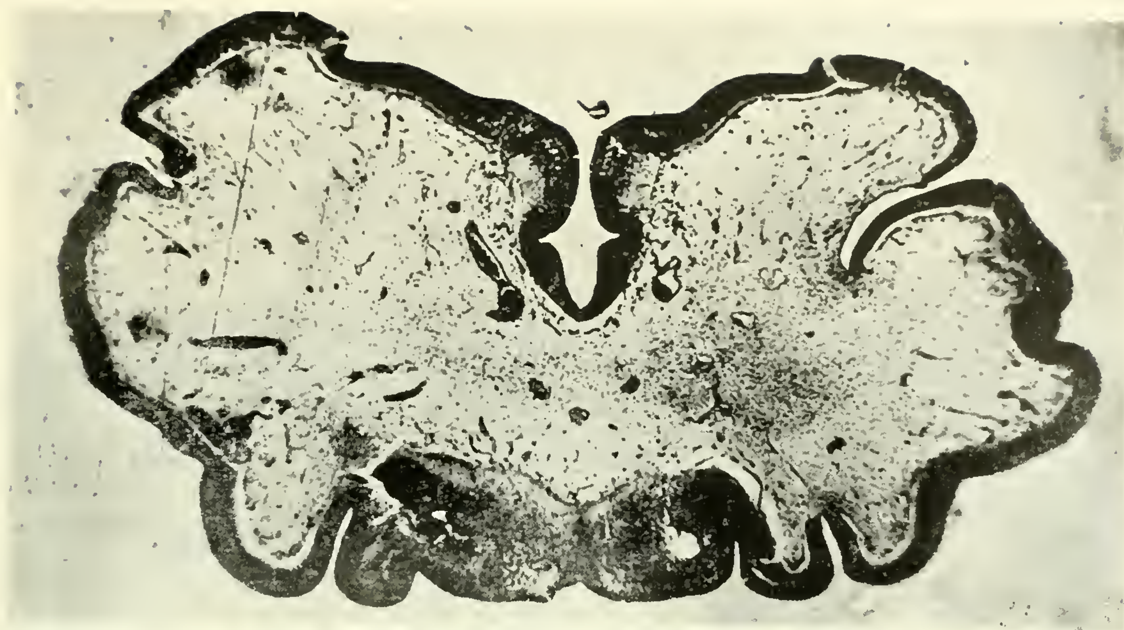


Fig. 257. — Secțiune transversală prin creierul „exencefal" la embrionul de găină.

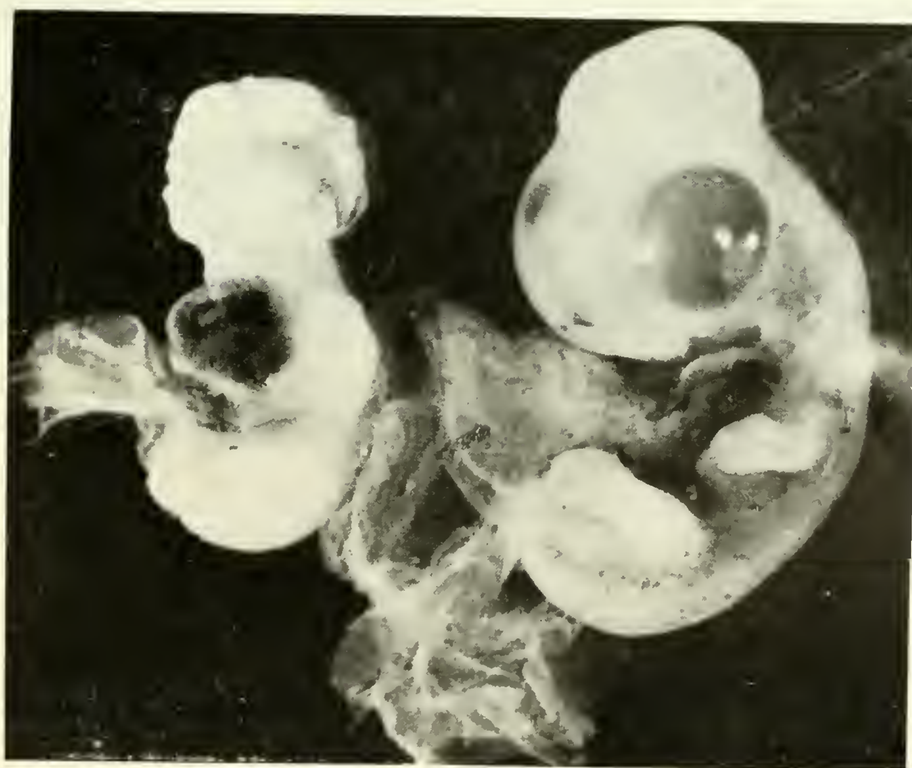


Fig. 258. — Embrion cu exencefalie spontană alături de un martor normal de aceeași vîrstă (7 zile).

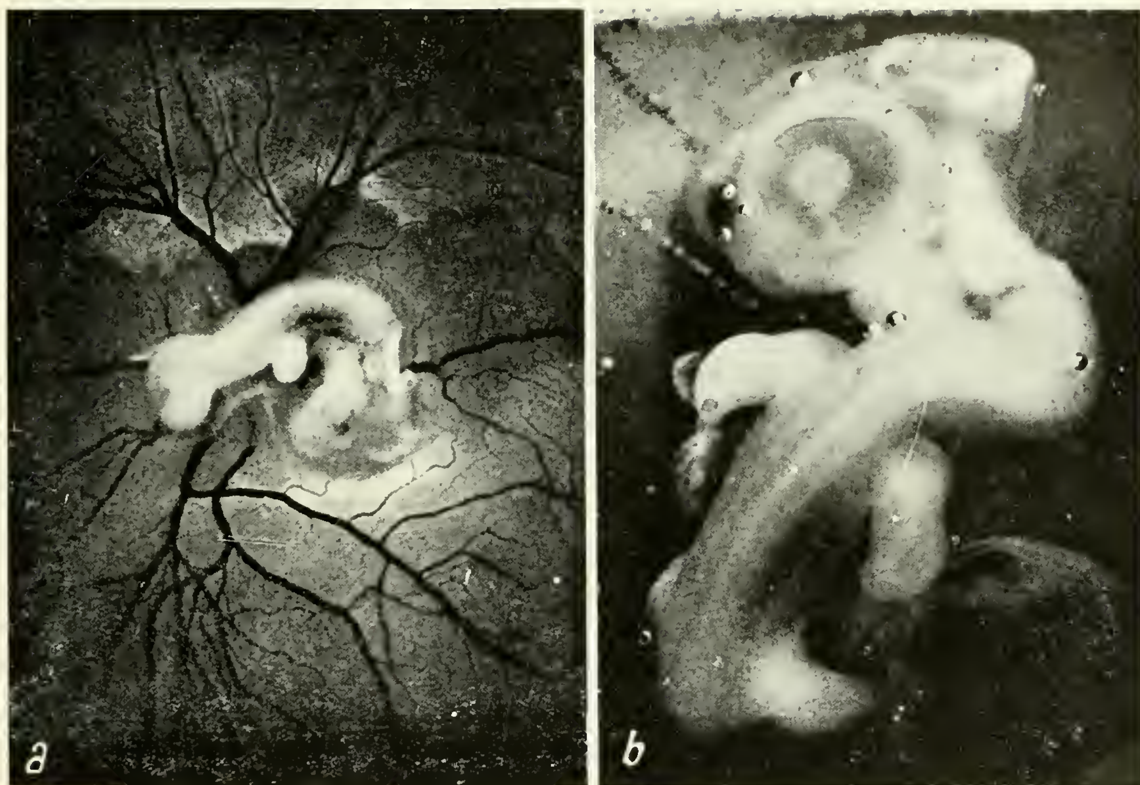


Fig. 259. — *a* — Embrion de găină de 7 zile de incubaţie, căruia i s-a deschis rombencefalul în a doua zi de incubaţie. Vedere *in situ* : se remarcă deschiderea la nivelul rombencefalului, conformaţia anormală a mezencefalului. Nu s-a dezvoltat vezicula alantoidiană. *b* — Acelaşi embrion scos din ou.

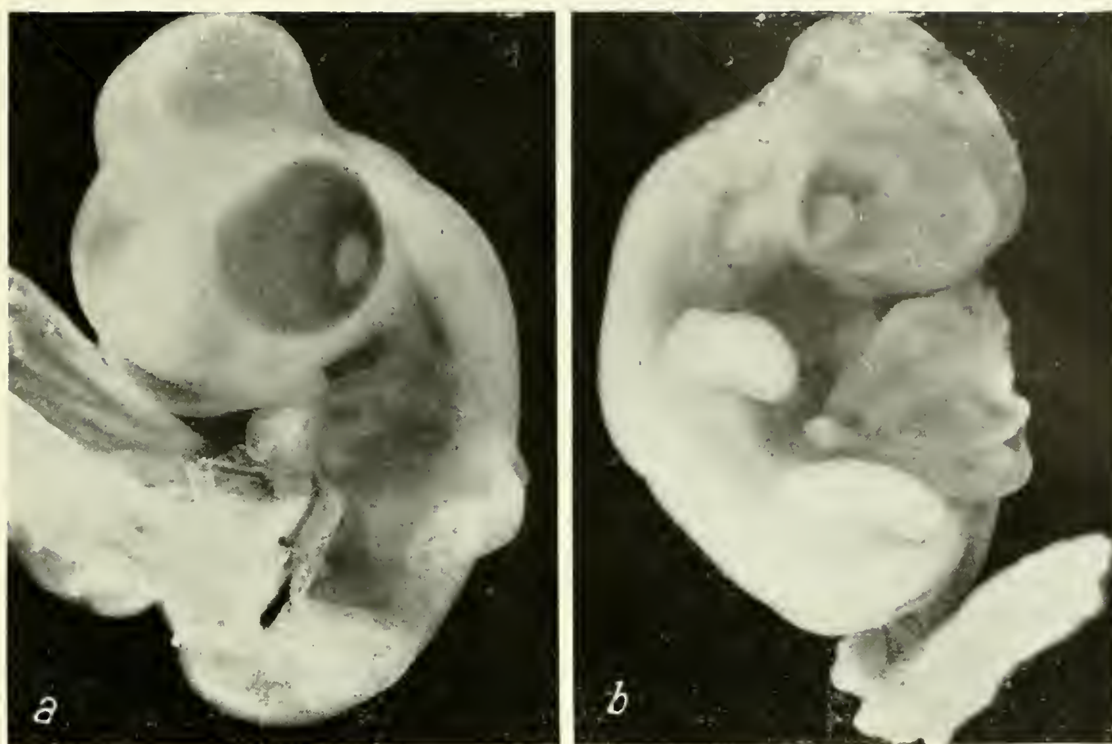


Fig. 260. — *a* — Embrion normal de găină la 7 zile de incubaţie. Se remarcă aspectul „balonat" al mezencefalului. *b* — Embrion cu tavanul rombencefalului deschis; aspect „cerebroid" al veziculelor cerebrale.



Fig. 261. — *a* — Embrion normal de găină la 8 zile de incubaţie. *b* — Embrion de aceeaşi vîrstă, cu rombencefalul deschis. Aspect anormal al mezencefalului, hemoragie ventriculară în telencefal.

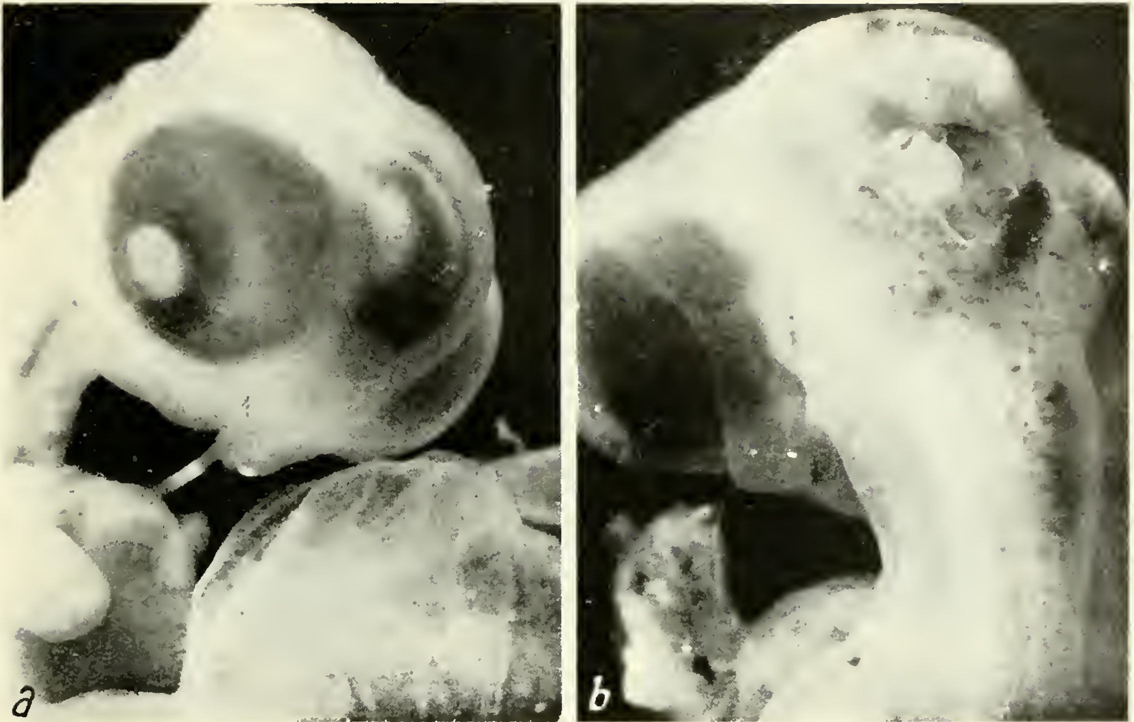


Fig. 262. — *a* — Embrionul din figura 261, detaliile capului embrionului. *b* — Orificiul rombencefalului.



Fig. 263. — Deschiderea rombencefalului la 18 de ore de incubaţie. Vedere a capului embrionului în a 12-a zi de incubaţie: hernie cerebrală la nivelul rombencefalului, apropiere anormală a bulbilor oculari.



Fig. 264. — Embrion cu deschiderea rombencefalului şi aspect „cerebroid" al veziculelor cerebrale, alături cu un embrion martor normal, cu aspect balonat al mezencefalului la 7 zile de incubaţie.

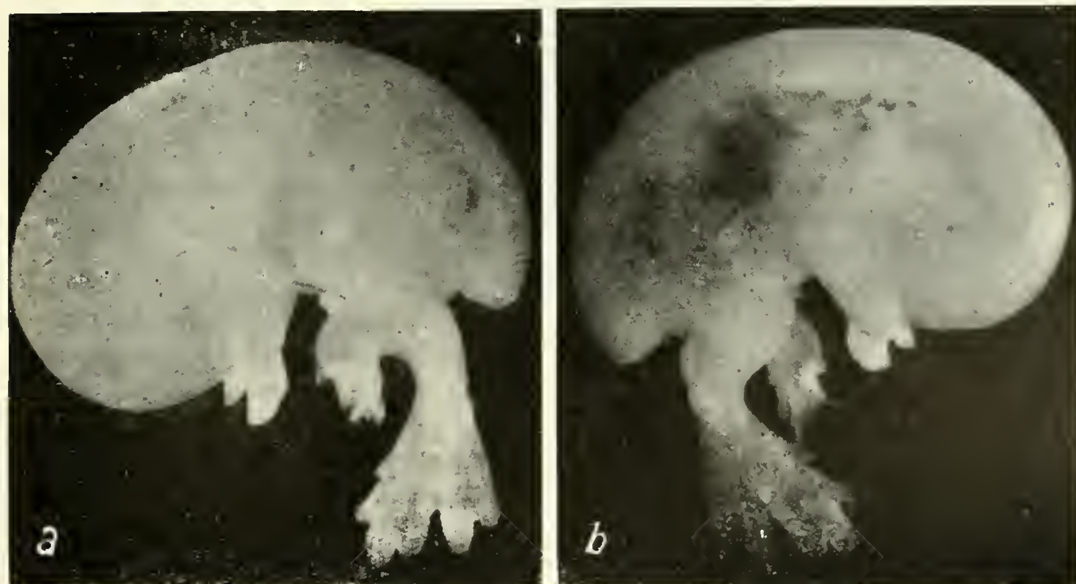


Fig. 265. — *a* şi *b* — Distrugerea prin electro-termocauterizare a pros- şi mezencefalului la 45 de ore de incubaţie. „Embrion bulbar" fixat la 9 zile de incubaţie.

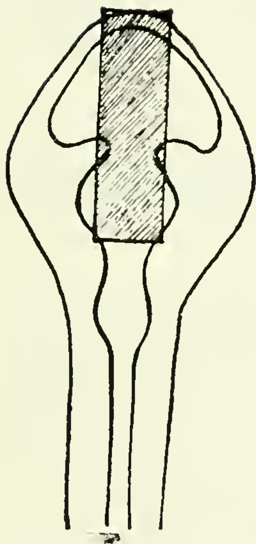


Fig. 266 — Dreptunghiul hașurat reprezintă regiunea asupra căreia s-a efectuat intervenția microchirurgicală.



Fig. 267. — Embrion bulbar din figura 265 în comparație cu un martor normal.

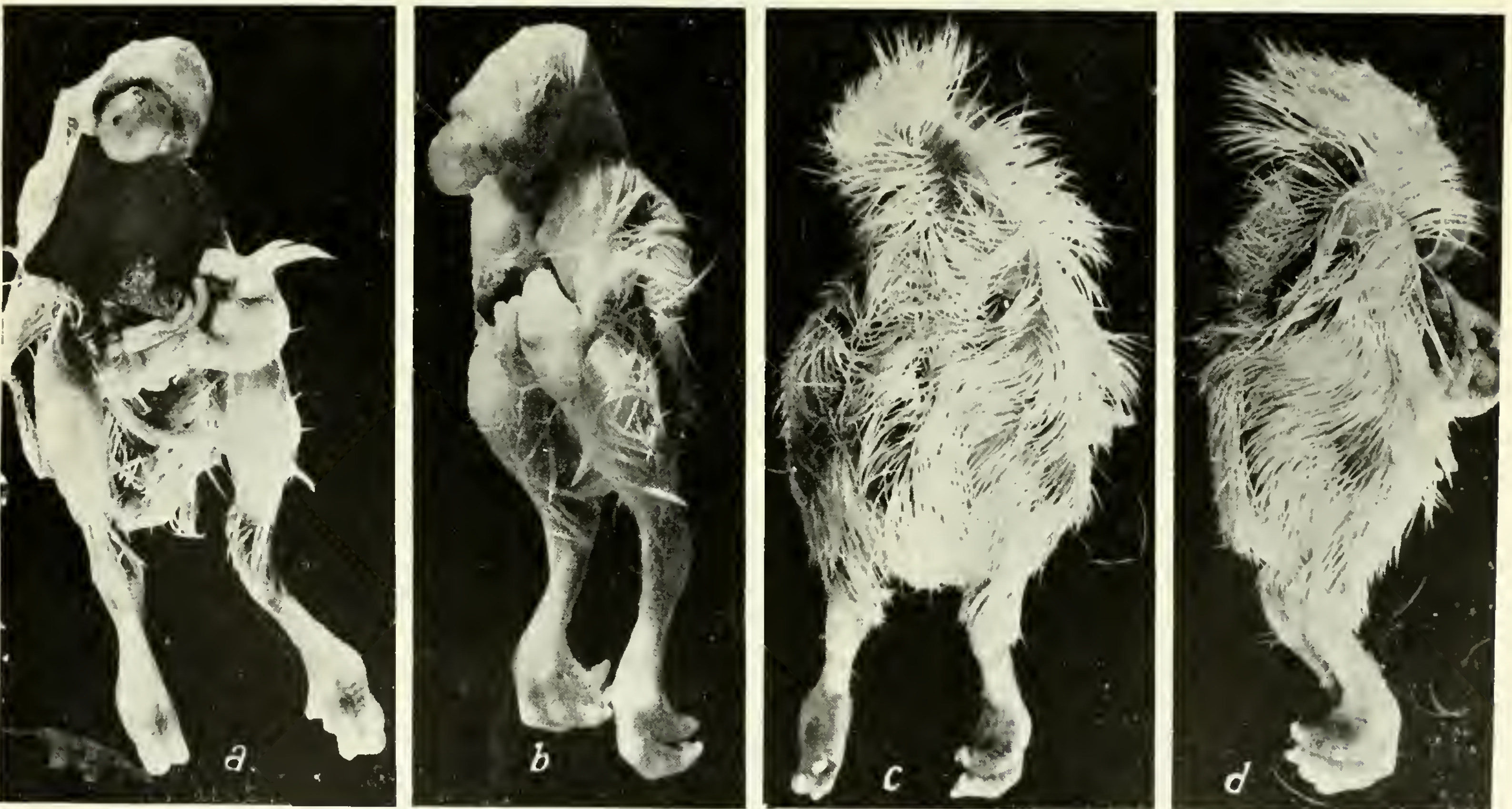


Fig. 268. — *a*, *b*, *c* și *d* — Embrion bulbar fixat la 16 zile de incubație. Distrugerea prin electrotermocauterizare a pros- și mezencefalului la 45 de ore de incubație. Celosomie.





Fig. 269. — *a* — Embrion de 17 zile de incubaţie. Electrocoagularea la 50 de ore de incubaţie, cu hemidistrugere parţială a pros- şi mezencefalului (drept). *b* — Patru formaţiuni chistice (rudlmente cerebrale) în regiunea „golită". Configuraţia cu „cioc încrucişat".



Fig. 270. — Embrion de 17 zile de incubaţie. Distrugerea parţială a telencefalului şi diencefalului la 50 de ore de incubaţie. Hernie a unui rudiment cerebral. Lipsa bilaterală a globilor oculari.



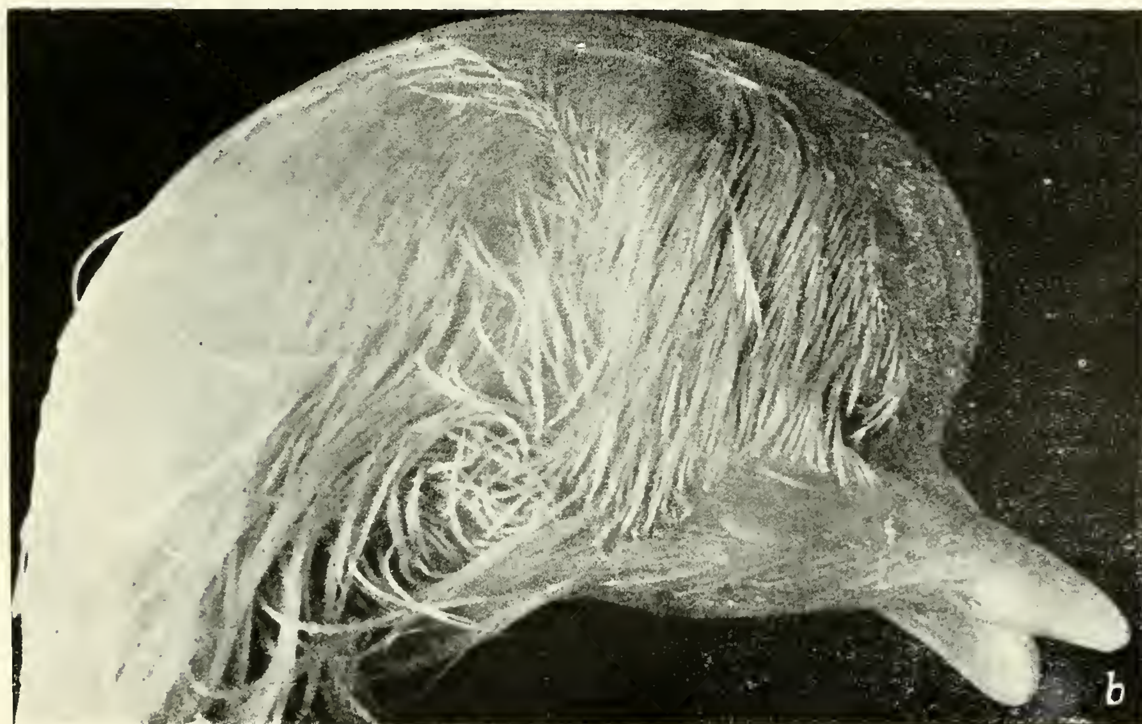


Fig. 271. — *a* şi *b*. — „Cioc încrucişat" obţinut prin extragerea lichidului amniotic.



Fig. 272. — Embrion de 9 zile de incubaţie. Lipsa globului ocular drept (electrotermocoagulare la 50 ore de incubaţie). Lipsa nervului optic şi a tractului optic corespunzător. Asimentria cavităţilor ventriculare. Atrofia diencefalului stîng.

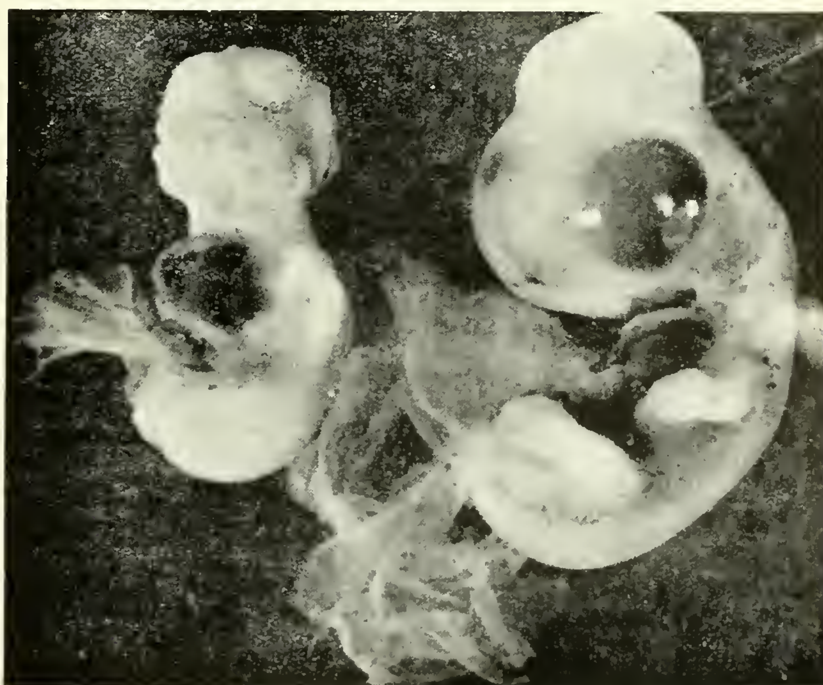


Fig. 273. — Anencefal spontan de 7 zile de incubaţie, în comparaţie cu un martor de aceeaşi vîrstă.





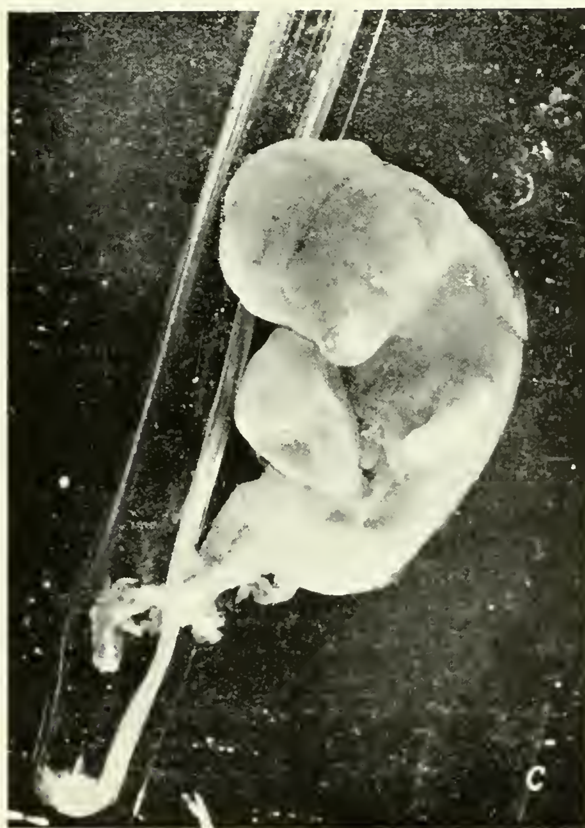


Fig. 274. — *a, b* şi *c* — Embrion de găină de 6 zile de incubaţie, cu malformaţie spontană, exencefalie cu aspect cerebroid al masei cerebrale.



Fig. 275. — Telencefalul embrionului de găină de 8 zile de incubație. Injectarea cu tuș a plexului vascular perivezicular.

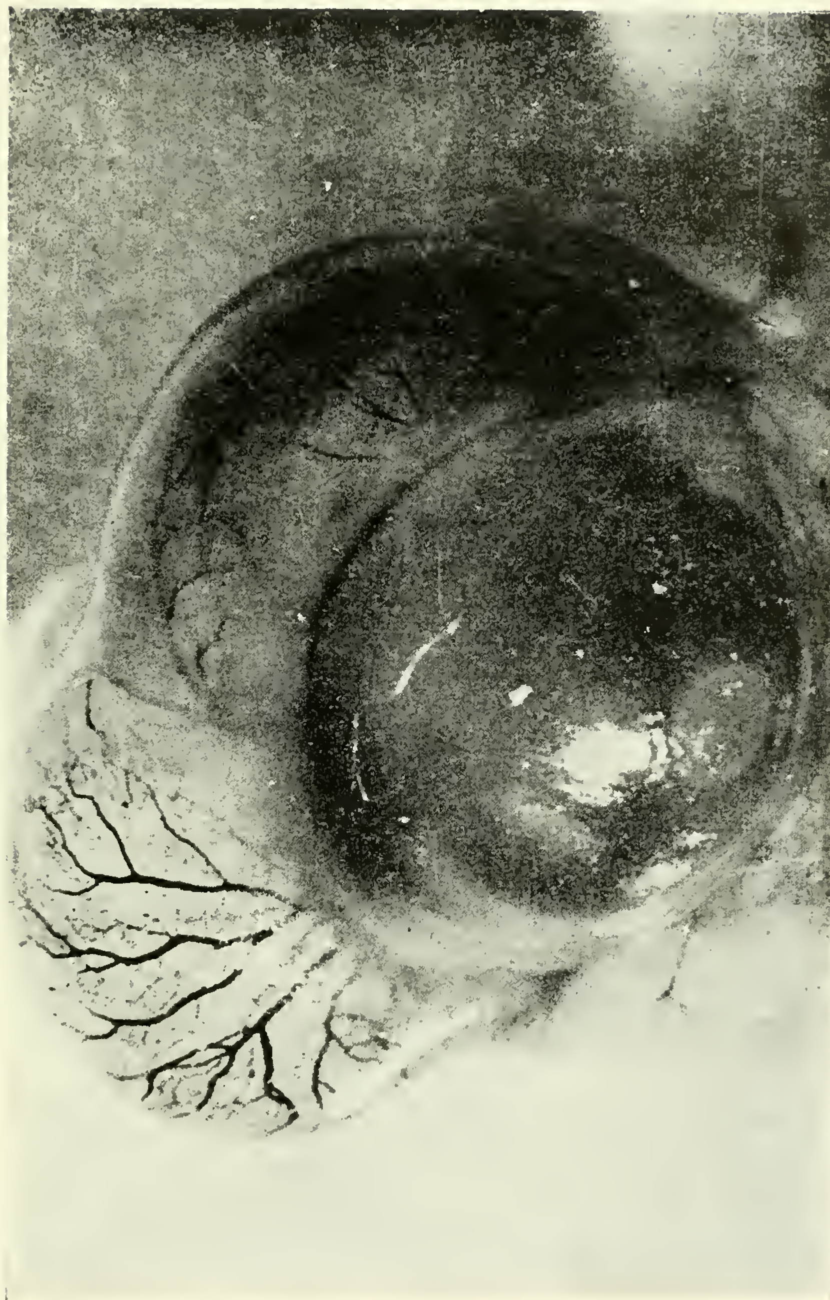


Fig. 276. — Embrion de găină în a opta zi de incubaţie. Injectarea vaselor cu tuş. Vascularizaţia veziculelor cerebrale.

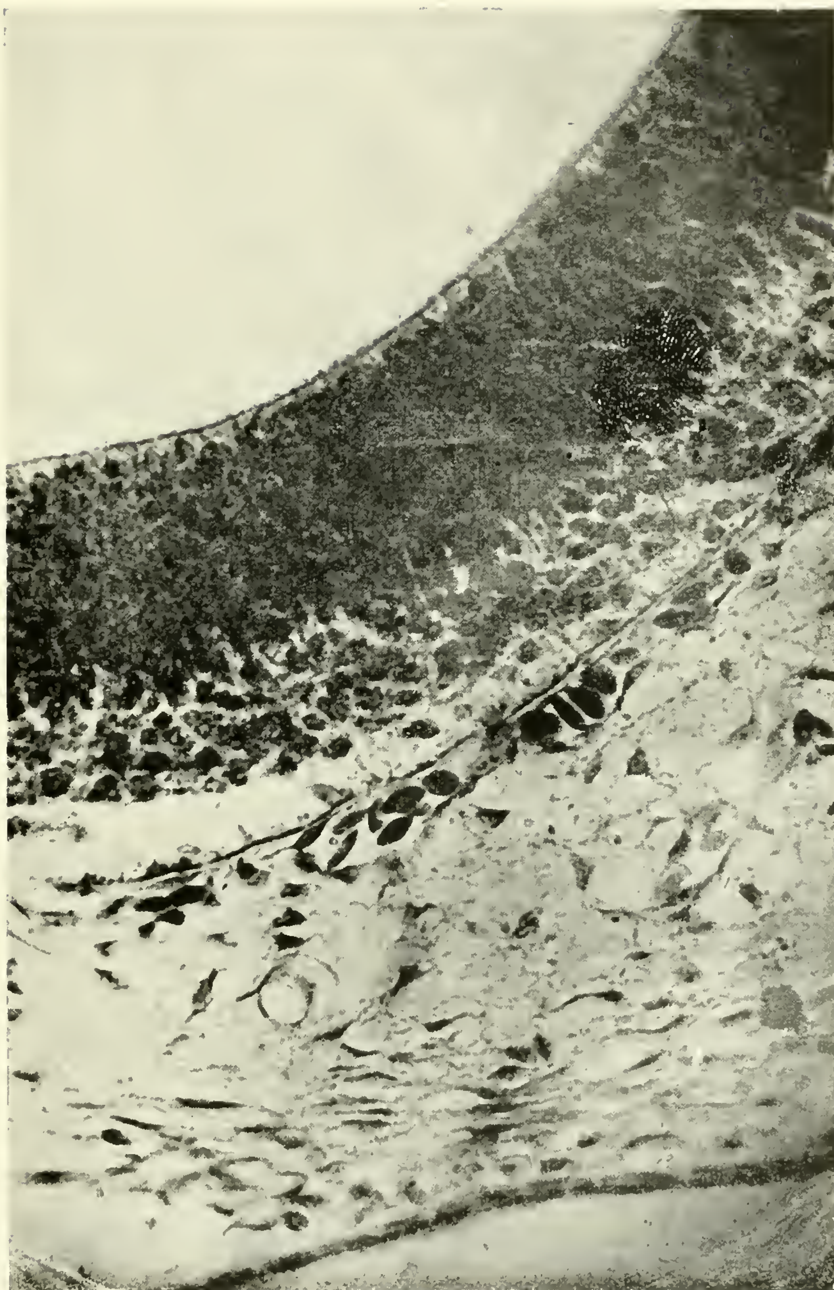


Fig. 277. — Secţiune prin peretele mezencefalului. Plexul vascular perivezicular cu eritrocite.

PARTEA A III-A

CERCETĂRI ASUPRA BIOLOGIEI HETEROGREFELOR

CONŢINUTUL

Concepţia miciurinistă a grefei; metoda apropierii preliminare, metoda mentorului, înlocuirea substanţelor embriotrofice, metodele de hibridare vegetativă la animale.

Cercetări preliminare în legătură cu factorii de creştere şi diferenţiere din ţesutul embrionului de găină.

Heterogrefele difuzoare de melanoblaşti şi promelanoblaşti.

Influenţa inervaţiei asupra factorilor de creştere şi diferenţiere în tegumentul embrionar.

Rolul tipului de ontogeneză.

CONCEPȚIA MICIURINISTĂ A GREFEI

M i c i u r i n a arătat că prin hibridare vegetativă se pot conferi organismelor vegetale, în anumite condiții, însușiri noi, durabile și transmisibile ereditar.

Între portaltoi și altoi se dezvoltă astfel interacțiuni prin substanțe care rezultă din metabolismul fiecărui partener al acestei concrescențe experimentale și care difuzează de la un partener la celălalt. Gradul de influențare reciprocă depinde, în mod esențial, de stadialitatea și plasticitatea partenerilor.

Pătrunderea și difuzarea acestor substanțe și includerea lor în metabolismul partenerilor influențează, în primul rînd, dezvoltarea organismului stadial tînăr și încă modificabil.

În felul acesta, metodele miciuriniste de hibridare vegetativă permit, ,,transmiterea'' unor însușiri la portaltoi sau de la portaltoi la altoi, după condițiile alese de experimentator.

Metoda hibridării vegetative permite — cum spune M i c i u r i n — zdruncinarea eredității și apariția unor modificări consolidabile și ereditar transmisibile.

De mare importanță este pentru noi definiția noțiunii de hibrid, dată de însuși M i c i u r i n, care consideră hibrid ,,(zdruncinat)'' orice organism la care prin încrucișare sau altoire, deci pe cale sexuală sau vegetativă, ,,vechile caractere ereditare sînt slăbite, fără a se statornici altele noi''.

Hibridarea vegetativă a devenit, în mîinile lui Miciurin, ale elevilor și continuatorilor săi, un mijloc de dirijare a organismelor vegetale și animale. Este important de reținut că, uneori, variația caracterelor obținute prin altoire pe cale vegetativă nu se manifestă la plante imediat în anul altoirii. Uneori modificările se realizează — cum a demonstrat G l u s c e n k o — de-a lungul mai multor generații succesive.

Pentru transpunerea în regnul animal a principiilor de hibridare vegetativă, deci pentru aplicarea principiilor miciuriniste de hibridare vegetativă la animale, sînt deosebit de importante trei metode miciuriniste, pe care le reamintim în rezumat.

Metoda apropierii preliminare. Această metodă urmărește obținerea unei încrucișări sexuale între soiuri sau specii la care, în mod normal, aceasta este imposibil sau foarte greu de realizat.

59 — c. 1778

Pentru a obține o încrucișare sexuată — care în mod obișnuit este greu sau imposibil de realizat—între o plantă hibridă (*a*) și o altă plantă (*b*). ramurile în vîrstă fragedă ale plantei (*a*) sînt altoite în coroana plantei (*b*) adulte. Modificările ce se produc în altoiul (*a*) sub influența sevei portaltoiului (*b*) produc modificări în florile altoiului (*a*), care duc la fecundabilitatea acestor flori cu polenul portaltoiului (*b*).

Metoda mentorului (educatorului). Și în metoda precedentă (a apropierii vegetative), portaltoiul a fost educatorul, deci mentorul altoiului stadial mai tînăr. Dar acest rol de mentor poate fi conferit și altoiului. Altoirea ramurilor luate de la un soi vechi în coroana unui tînăr puiet poate îndrepta dezvoltarea puietului în direcția altoiului și în felul acesta se poate obține o plantă cu caractere hibride, ale altoiului și ale portaltoiului.

După ce componenta plastică, „educabilă", deci partenerul stadial tînăr, a suferit influența mentorului, ea poate fi despărțită de mentor și cultivată mai departe de sine stătătoare.

În asemenea condiții se pot observa statornicirea caracterelor nou dobîndite și transmisibilitatea lor ereditară, sexuală și vegetativă.

Între cei doi parteneri, caracterul de educator sau mentor îl are deci cel stadial mai vechi, iar caracterul de educat îl are partenerul tînăr cu ereditate încă nefixată, în formare.

Mai există și alte metode de reglare a interacțiunii dintre cei doi componenți (parteneri) reuniți vegetativ. Astfel, reducerea sistemului folial (a suprafețelor asimilatoare) al unui partener îl va subordona acțiunii sevei elaborate de sistemul folial al celuilalt partener, rămas cu suprafața mai mare (deci mai activă) de asimilare.

A treia metodă constă în înlocuirea substanțelor embriotrofice necesare embrionului în timpul dezvoltării sale ; de exemplu : așezarea embrionului vegetal pe un endosperm, aparținînd altui soi sau altei specii, metoda „lumînării" a lui G l u s c e n k o etc.

Din cele trei principii (metode miciuriniste) expuse se pot deduce prețioase indicații experimentale pentru aplicarea hibridării vegetative la animale, și anume :

— împreunarea a două organisme animale în diferite variante ;
— folosirea grefelor embrionare ;
— folosirea diferenței stadiale a partenerilor și
— folosirea diferențelor intensității și tipului de metabolism la parteneri.

În ceea ce privește proveniența partenerilor sînt importante, în primul rînd, diferențele de rasă, subspecie, specie și, cum vom demonstra mai tîrziu, diferențele tipului de ontogeneză și, în general, ale condițiilor de mediu asimilate de parteneri și ascendenții lor.

Transpunînd la organisme animale metodele hibridării vegetative folosite de M i c i u r i n constatăm că cei doi parteneri împreunați pot fi : organisme complete, capabile să trăiască și să se dezvolte și independent, sau unul dintre ei poate fi reprezentat de un organ, țesut, grup de celule sau substanța vie necelulară. Prin „organismul complet" înțelegem organismul pe deplin dezvoltat sau în diferitele sale faze ontogenetice, chiar cele mai precoce, ca zigotul, placa embrionară etc., deci forme care au valoarea morfo-funcțională biologică de organisme, putînd deveni prin dezvoltare organisme de sine stătătoare. Aici combinația partenerilor poate varia în sensul creării unei coexistențe între cele două organisme, dintre care unul este pe deplin dezvoltat, iar celălalt, într-unul din stadiile ontogenetice mai tinere, ceea ce ar reprezenta o combinație heterostadială. Dacă amindoi

partenerii se găsesc în același stadiu ontogenetic, acest stadiu poate fi precoce sau înaintat (homeostadialitate precoce sau înaintată).

În toate aceste cazuri, însă, putem vorbi de echivalența partenerilor, luînd drept criteriu valoarea biologică de organism „complet" a componenților.

În această categorie a echivalenței partenerilor intră parabiozele (împreunări vegetative de organisme pe deplin dezvoltate), împreunări între un partener înaintat și unul embrionar, sau grefarea unui fragment de organism animal, capabil să se transforme în condiții favorabile într-un organism întreg.

Unul dintre componenții cuplului creat artificial poate fi însă și un organ, țesut, grup de celule sau substanță vie necelulară, care se grefează pe un organism complet, în diferitele sale faze ontogenetice.

În acest caz, cei doi „parteneri" nu mai pot fi considerați ca echivalenți din punctul de vedere expus mai sus. Unul dintre componenți poate prezenta diferitele trepte de organizare ale substanței vii, fără să atingă valoarea biologică a unui organism „complet". În ambele cazuri, componenții pot aparține la aceeași rasă, varietate, specie sau subspecie etc., sau cuplul este heterorasial, heterospecific etc.

Cum vom arăta mai jos, sînt deosebit de importante și diferențele dintre parteneri care țin de tipul de ontogeneză, cum ar fi celedintre speciile de păsări nidifuge și nidicole.

Desigur că în cazul unei homeogrefe nu se poate vorbi de o hibridare vegetativă propriu-zisă. Totuși, heterostadialitatea partenerilor poate fi luată în considerare ca factor producător de modificări al procesului ontogenetic, utilizabil în dirijarea dezvoltării organismelor.

Rezultă deci următoarele posibilități de combinare între parteneri:

perechi echivalente,

perechi neechivalente,

homeogrefe sau heterogrefe, homeo- sau heterostadiale.

Indiferent însă de natura combinațiilor, în ultima linie hibridarea vegetativă se bazează pe asimilarea de substanțe „plastice" elaborate de un partener cu ereditate diferită. Alegerea și felul combinației partenerilor nu fac decît să asigure pe de o parte sursa și, pe de altă parte, terenul de acțiune al acestor substanțe.

Ceea ce deosebește în mod pregnant condițiile existente în hibridarea vegetativă la plante de cele de care trebuie ținut seama la hibridarea vegetativă la animale este modul de reactivitate al organismului animal și îndeosebi reactivitatea sa neuro-umorală.

Este bine să privim schimbul de substanțe dintre cei doi parteneri împreunați și din punctul de vedere al structuralității, adică al etajelor structurale morfologice la nivelul cărora se produc de fapt difuzarea și combinarea elementelor aparținînd partenerilor[1]).

Împreunînd partenerii putem în principiu să prevedem următoarele posibilități: schimbul se menține la nivelul substanțelor fără structură celulară sau el cuprinde și nivelul celular, ba chiar și cel al structurilor multicelulare, care participă în acest caz la procesul de întrepătrundere.

Biologia tradițională a denumit formațiunile hibride care rezultă dintr-un amestec de celule provenite de la organisme aparținînd la specii sau rase diferite: „himere". Unii autori cred și în posibilitatea unei contopiri extragerminale de celule („burdonismul").

---

[1]) Vezi Anexa I.

Himerele sînt deci privite de biologia tradițională ca niște amestecuri mecanice de elemente morfologice heterogene, negîndu-se principial posibilitatea creării hibrizilor vegetativi „prin influență”, adică prin difuzarea de substanțe capabile să influențeze însuși metabolismul partenerilor, silindu-i să se adapteze noilor condiții astfel create.

Noi credem că elementele structurale vii ale implantului — indiferent cărui etaj morfologic sau structural i-ar aparține — o dată difuzate în portimplant (gazdă) vor putea modifica metabolismul acestuia, suferind — la rîndul lor — și influența gazdei. Pe de altă parte, pătrunderea de elemente aparținînd gazdei (portgrefonului) în grefon, invadarea lui de către capilare sanguine, substanțe interstițiale și fibre nervoase ale portgrefonului etc. vor face ca grefonul să sufere din plin influența gazdei.

Noi sîntem convinși că pătrunderea elementelor celulare dintr-o grefă în portgrefă sau invers este totdeauna întovărășită sau chiar pregătită de o pătrundere de diferite substanțe (plasmă, lichid interstițial, substanțe intracelulare, diferite increte active etc.).

Asimilarea [1]) forțată a substanțelor active de diferite categorii va putea produce în anumite condiții modificări ale tipului de metabolism al partenerului și prin aceasta modificări ale structurii sale morfo-funcționale.

O condiție esențială în tehnica experimentală o constituie alegerea momentului împreunării, în așa fel încît grefonul să acționeze asupra portgrefonului într-o perioadă de deosebită plasticitate a acestuia.

În literatura sovietică au apărut importante lucrări experimentale, în care se aplică la animale principiile miciuriniste ale hibridării vegetative. Aceste cercetări deschid perspectivele ameliorării unor rase de animale cu valoare economică și ale producerii de rase noi. Din punct de vedere teoretic, lucrările biologilor sovietici dovedesc influența reciprocă a partenerilor animali în experiențele de hibridare vegetativă, fundamentînd astfel genetica miciurinistă. Efectul acestor influențe se manifestă nu numai la parteneri ci și la descendenții lor.

Transmiterea la descendenți a unor caractere noi, dobîndite pe cale extrasexuală, prin influența unor substanțe plastice, provenite de la un organism cu metabolism diferit, constituie esența fenomenului hibridării vegetative.

La transpunerea metodelor de hibridare vegetativă de la plante la animale, autorii sovietici au putut menține în unele privințe un paralelism între metodica aplicată la vegetale și cea aplicată la animale. În alte părți însă, particularitățile partenerilor animali au impus tehnici noi, adecvate.

CLASIFICAREA METODELOR SOVIETICE DE HIBRIDARE VEGETATIVĂ APLICATE LA ANIMALE

1. **Transplantarea de ovare.** Implantarea într-un organism feminin (portgrefă, „mama adoptivă”) a ovarului unei donatoare de altă rasă. Se urmărește dezvoltarea embrionilor și puilor rezultați din fecundarea ovulelor străine: *a*) cu sperma rasei care a furnizat ovarul sau b) cu sperma de aceeași rasă cu portgrefa.

[1]) Termenul de „asimilare” are aci un înțeles diferit de cel pe care îl dăm în fiziologia normală. Dacă are loc o asimilare de substanțe în sensul pierderii complete a specificității lor, nu va putea rezulta nici un fenomen de hibridare vegetativă.

2. **Transplantarea de ovule fecundate.** Aici partenerul (*a*) este reprezentat de un organism adult femenin. Partenerul (*b*) este de fapt ovula fecundată și mai tîrziu embrionul aparținînd unei alte rase. Ovula fecundată de altă rasă este introdusă în oviductul partenerei printr-o intervenție chirurgicală.

3. **Schimb de albuș între ouă** provenite de la păsări de rasă sau specie diferită.

4. **Hibridarea vegetativă prin transfuzii de sînge.** Aici, ca și la punctul 3, partenerii nu mai vin în contact direct, ci se folosește numai un țesut sau un produs al unui partener, care se introduce în celălalt.

5. **Concrescența a două animale de rase sau specii diferite.** Prin această metodă se realizează chirurgical o unire temporală, de exemplu a cavităților peritoneale ale celor doi parteneri.

6. **Metoda mentorului sexual.** Această metodă constă în asimilarea de către organismul matern și a spermatozoizilor care nu servesc direct la fecundație. Se folosesc și amestecuri de sperme homeorasiale, heterorasiale sau heterospecifice.

Se vede că metodele citate lucrează fie cu perechi de parteneri echivalenți, homeo- sau heterostadiali, heterorasiali sau heterospecifici, fie cu parteneri neechivalenți, dintre care numai unul reprezintă un organism complet, capabil să asimileze substanțe elaborate de un alt organism, cu care însă primul nu mai vine în contact direct.

Indiferent însă de modul de oferire al substanțelor active în toate aceste variante experimentale de combinare a partenerilor, se urmărește modificarea metabolismului organismului silit să introducă în mediul său intern aceste substanțe.

În cazul concrescenței a doi parteneri animali, care au depășit stadiile evoluției embrionale și fetale și nu se mai află în dependență față de organismul matern sau de rezervele trofice acumulate de acesta, influențarea reciprocă depinde în mare măsură de reactivitatea sistemului neuro-umoral al partenerilor, care asigură în același timp unitatea organică interioară și legătura cu mediul ambiant. Aici trebuie contat însă pe întreaga gamă a reacțiilor imunobiologice.

Partenerii reuniți prin concrescență devin astfel unul pentru celălalt, în mod reciproc, excitanți extero- și interoceptivi (aceasta mai cu seamă prin acțiunea substanțelor schimbate reciproc).

Trebuie să considerăm ca aparținînd problemei generale a hibridării vegetative vastul material experimental existent referitor la contopirea embrionilor întregi în stadiul de blastomere, implantările de porțiuni de gastrulă sau neurulă, respectiv schimbări de asemenea porțiuni între embrioni de rasă sau specie diferită, parabioza embrionară pe cale sanguină, parabioze experimentale între animale pe deplin dezvoltate.

Este evidentă și legătura problemei hibridării vegetative cu cea a transplantării terapeutice heteroplastice de țesuturi sau organe.

Majoritatea covîrșitoare a cercetătorilor care stau pe pozițiile geneticii tradiționale formale și care s-au ocupat cu problema transplantării interpretează însă rezultatele obținute de pe pozițiile mecaniciste. Interacțiunilor care se pot dezvolta între un heterotransplant și o gazdă nu li se acordă decît o importanță secundară și unilaterală. Preocupîndu-se în primul rînd de fenomenele de intoleranță, de intoxicația parabiotică, de puterea antigenică a implantului cu formarea anticorpilor în gazdă, se trece cu vederea posibilitatea obținerii în gazdă a unor calități noi, care îi pot fi conferite de o grefă.

În arsenalul terapeuticii actuale, transplantarea de organe sau țesuturi constituie o metodă importantă, cu perspective de dezvoltare. În concepția tradițională a practicii grefelor, a transplantării terapeutice, implantul este în majoritatea cazurilor considerat ca înlocuitorul unei pierderi de substanță sau de funcție, suferită de primitorul transplantului.

În această concepție, grefonul este deci un înlocuitor morfo-funcțional mai mult sau mai puțin perfect.

În alte cazuri, grefa servește numai ca structură de sprijin pentru un regenerat propriu al gazdei, avînd deci numai un rol trecător.

Cu concepția „grefei de înlocuire'' nu se epuizează încă totalitatea posibilităților biologice ale grefelor.

Embriologia experimentală a scos la iveală extraordinare efecte de interacțiune care se pot obține în cazul implantării homeo- sau heteroplastice a unor părți ale corpului embrionar, în anumite perioade ontogenetice. După cum se știe, o grefă a buzei dorsale a blastoporului, la amfibieni de pildă, poate determina dezvoltarea heterotopă a unui întreg sistem axial (tub neural, somite etc.) pe lîngă cel propriu al primitorului (S p e e m a n). Alt exemplu din literatura recentă : homeogrefe de organe care pot provoca hipertrofia organului corespunzător propriu al gazdei (P. W e i s s).

Vastul material experimental adunat de I. V. M i c i u r i n și de elevii lui, în legătură cu hibridarea vegetativă la plante, dar și datele experimentale obținute pe animale, au lărgit considerabil conceptul biologic al raporturilor care se pot stabili între o grefă și o portgrefă (gazdă). La animale îndeosebi, aceste date trebuie puse în concordanță cu cele ale cercetărilor imunobiologice.

Grefa apare nu numai capabilă să înlocuiască funcții pierdute sau defecte de substanță ale gazdei : prin schimbul și asimilarea reciprocă a produselor se pot produce influențări în ambii parteneri, de natură și grad diferit. Concepția miciurinistă a grefei lărgește deci principial domeniul aplicabilității și eficacității transplantelor, trecînd de la „transplantul de înlocuire'', la „transplantul de conferire de însușiri noi'' (transplantul „de transformare'', „de modificare'', de „dirijare'') [1]).

Homeo- sau heterogrefa ar putea să fie deci nu numai o parte vie de origine străină care s-a integrat în gazdă și care continuă să trăiască și să funcționeze în noul mediu, ci și o sursă de substanțe necelulare sau celulare, care, difuzînd în gazdă, îi conferă însușiri noi, imprimînd țesuturilor acesteia caractere noi morfo-funcționale. Într-adevăr, schimbul de substanțe între implant și gazdă se poate caracteriza și prin domeniul morfologic căruia (sau cărora) îi aparțin elementele care participă la acest schimb. Astfel, o grefă multicelulară poate să difuzeze și să primească celule, structuri subcelulare, substanțe intracelulare, grupări macromoleculare, compuși chimici cu molecule mai mici etc.

Metoda izotopilor radioactivi (a atomilor marcați) permite decelarea unei difuziuni dintr-o sau într-o grefă pînă la nivelul macro- și micromolecular. (Prin autoradiografia, contorul Geiger-Müller).

Metoda folosită de noi în cercetările pe care le vom prezenta pe scurt în acest capitol permite decelarea difuziunii la nivelul celular, lucrînd cu celule „marcate'' prin pigment.

„Infecția'' cu celule pigmentare, difuziunea melanoblaștilor dintr-o grefă în perioada posteclozională (respectiv postnatală) sau în perioada embrionară a fost studiată în mod multilateral și amănunțit de numeroși autori, îndeosebi de B. H. W i l l i e r, R o w l e s,

---

1) Ultimul termen mi-a fost sugerat de acad. V. Mirza.

Danforth, Billingham, Medawar, Dorris și Du-Shane. Vom reveni asupra lucrărilor acestor autori.

Grefa Filatov (în țesutoterapie), deși nu reprezintă un transplant viu, trebuie totuși menționată aici, avînd o poziție intermediară între grefa de înlocuire și grefa de influențare ca difuzoare de biostimulatori de care beneficiază țesuturile adiacente sau chiar îndepărtate locului grefei.

Desigur că heterogrefele constituie categoria principală a grefelor capabile să confere însușiri noi.

Or, la organisme în fazele ontogenetice postnatale, asemenea grefe, în majoritatea cazurilor, nu sînt tolerate.

Mijloace de neutralizare a antigenității heterogrefelor sau a învingerii intoxicației parabiotice au fost sugerate și încercate. Înfometarea prealabilă a gazdei, tratamentul prealabil al gazdei cu extracte sau țesuturi ale viitorului donator, ar produce o oarecare toleranță față de heterotransplante. Această metodă a fost sugerată pentru prima dată de Schoene (1908). R. E. Billingham, P. B. Medawar și F. Brent au constatat mai tîrziu că, într-adevăr, injecția sîngelui viitorului donator de tegument în circulația embrionului viitorului primitor conferă toleranța față de un heterotransplant tegumentar. Recent, pe această bază, M. Hașek a dezvoltat o tehnică de parabioză între embrionii de găină prin comunicarea vaselor alantoidiene, obținînd la parteneri, după ecloziune, homeotransplantări reușite de tegument.

După P. B. Medawar, doze zilnice de 10 γ de cortizon prelungesc viața transplantelor de piele la șobolani. Efectele antigenice ale homeo- și heterotransplantelor pot fi blocate prin acțiunea ACTH-ului și a antihistaminicelor.

Există deci perspective ca, într-un viitor nu prea îndepărtat, aplicabilitatea homeo- și heterotransplantelor să se lărgească considerabil.

Noi am întreprins cercetarea comportării heterotransplantelor formate de țesuturi și organe embrionare și introduse în gazde embrionare, deci în condiții de toleranță naturală, embrionul neavînd încă dezvoltată reactivitatea față de elemente heterogene. În asemenea condiții, biologia homeo- și heterotransplantelor poate fi studiată nestingherit de fenomenele de intoleranță, existente la adult. Prin aceste cercetări am urmărit însă nu numai studiul comportării heterotransplantelor sau a gazdelor, în sensul influențării reciproce și a dobîndirii unor însușiri noi. Noi ne folosim aici de metoda heterotransplantării embrionare și pentru cercetarea și analiza unor factori morfogenetici activi în ontogeneza embrionară normală.

Experiențele pe care le vom descrie urmăresc cercetarea efectelor heterotransplantelor de tegument interrasiale, interspecifice și între tipuri diferite de dezvoltare a donatorului și primitorului.

După cum se știe, aceste heterotransplante de tegument la embrion se arată capabile să confere un colorit unei gazde necolorate sau să-i supraadauge, în cazul cînd gazda aparține unei specii colorate, un pigment nou.

Experiențele descrise mai jos sînt concepute ca modele experimentale pentru studiul transferului de substanțe și celule din grefă în gazdă și invers. Credem că ele permit sezisarea unor factori activi de care depinde soarta elementelor difuzate și a combinației hibride care rezultă din interacțiunea elementelor heterogene cu țesuturile gazdei sau grefei.

Vom evidenția de asemenea manifestările tipului de ontogeneză de la începutul procesului de dezvoltare.

CERCETĂRI PRELIMINARE ÎN LEGĂTURĂ CU FACTORII DE CREȘTERE ȘI DIFERENȚIERE DIN TEGUMENTUL EMBRIONULUI DE GĂINĂ

După cum se știe, la embrionul de găină apar, în jurul celei de a șaptea zile de incubație, în tegumentul pînă acum morfologic homogen, zone de creștere intensă, întîi difuze, apoi net delimitate, dermo-epidermice, primordiile papilelor pufului (fig. 278 și 279).

Se remarcă întîi o condensare a mezenchimului subiacent epiteliului ectodermic. tegumentar, condensare care este inițial continuă, dar care apoi se concentrează asupra unor parcele delimitate. La nivelul acestor condensări dermice, epiteliul ectodermic prezintă o îngroșare, devenind multistratificat. Numărul mitozelor crește rapid în aceste zone. Paralel cu acest proces se dezvoltă rețeaua capilară dermică iar inervația devine bogată.

Împreună cu M. Deleanu și B. Litvac am studiat prin injectarea de tuș dezvoltarea irigației tegumentului embrionar (fig. 280, 281, 282, 283 și 284). Introducînd tușul într-o venă alantoidiană, am obținut injectarea totală a embrionului și anexelor sale. Vascularizația tegumentului a fost urmărită cu ajutorul acestei metode la embrionii de 9, 12 și 13 zile de incubație.

La embrionul de 9 zile de incubație apare o rețea dermică de vase capilare, iar pe un plan mai profund, trunchiurile vasculare care alimentează această rețea. Nu se pot observa încă în acest moment anse capilare pătrunse în primordiile penelor embrionare. Aceste primordii, pe măsură ce se dezvoltă, primesc vase din rețeaua capilară dermică. În zilele următoare, dar mai ales în a 12-a, a 13-a zi de incubație, primordiile penelor embrionare cresc foarte repede. În această perioadă, și rețeaua vasculară dermică devine mai bogată (fig. 280, 281 și 282).

La embrionul de 12 zile de incubație, toate papilele penelor embrionare sînt bogat vascularizate, prezentînd în interiorul lor anse capilare anastomozate, alimentate din rețeaua dermică subiacentă (fig. 283 și 284). Gradul de dezvoltare și aspectul rețelei vasculare intrapapilare urmează la această dată ritmul de dezvoltare a primordiilor penelor embrionare. Rețeaua capilară intrapapilară ajunge la o dezvoltare spectaculară. Primordiile pufului embrionar fac acum impresia unor organe bogat vascularizate, învelite într-un epiteliu. În fazele avansate de diferențiere ale primordiilor penelor embrionare, rețeaua capilară străbate pana embrionară pînă la vîrful ei (fig. 282).

Pe măsură ce se dezvoltă vascularizația papilelor începe depozitarea de substanțe în epiteliul fanerelor. Keratinizarea acestor epitelii necesită un aport de substanțe proteice. Acumularea de acid uric și de substanțe cu rol în pigmentare, substanțe care ulterior vor fi eliminate cu ocazia năpîrlirilor, ne sugerează ideea unei funcții excretoare a acestor papile dermo-epidermice, funcție ce nu se limitează numai la depunerea substanțelor în epiteliul papilar.

După părerea noastră, bogata vascularizație care se dezvoltă în tegumentul și primordiile pufului embrionar este în legătură și cu o activitate excretoare înspre lichidul amniotic.

În ceea ce privește inervația tegumentară, am putut constata, împreună cu M. Deleanu, intensificarea netă a dezvoltării rețelelor nervoase dermice, care merge paralel cu diferențierea fanerelor. Începînd cu a șaptea zi de incubație, impregnațiile argentice făcute de noi evidențiază apariția unor trunchiuri nervoase, care pătrund în derm, se ramifică acolo, formînd o rețea dermică, ce trimite în fiecare papilă — primordiul fanerei

embrionare — un fascicul format din cîțiva axoni, pătrunzînd în axa conjunctivo-vasculară a papilei în vecinătatea vasului capilar (fig. 285).

Factorii actuali, care determină această comportare a unor parcele ale tegumentului embrionar, de altfel strict specific repartizate, sînt tot atît de puțin cunoscuți ca și cei prezenți și activi la apariția altor primordii de organe în corpul embrionului.

În afara convingerii noastre, că totalitatea complexului embrionar [1]), prin interacțiunea complicată a tuturor componenților săi, creează, în decursul dezvoltării individuale, diferențele și particularitățile locale care, o dată apărute, vor participa la rîndul lor la interrelații în sînul acestui complex, nu cunoaștem decît foarte puțin forțele motrice concrete, actuale, local prezente și active, cărora li se datorează, în ultima linie, un proces cum este de pildă formarea papilelor dermo-epidermice. Nu vom intra aici în detaliile teoriilor localizării și determinării embrionare.

Genetica tradițională nu poate explica localizarea decît invocînd efecte de interacțiune între un anumit mediu în prealabil constituit și un ansamblu de purtători de potențialități, dintre care (înăuntrul acestui mediu dat) se poate realiza (conform acestei teorii) numai cîte o mică parte, și anume tocmai ceea ce se observă în realitate. Nici fenomenele de inducție, observate de S p e e m a n și școala lui, nu explică mecanismul intim al localizării, ci îl constată numai în anumite condiții experimentale (raporturi între primordii).

Noi am ales ca obiect de studiu papilele dermo-epidermice fiindcă ele, prezentînd aceeași problemă generală a localizării și determinării ca și celelalte primordii de organe, sînt mai ușor accesibile experimentării și observației.

Studiul relațiilor dintre zonele de creștere intensă, dermo-epidermice și melanoblaștii proprii (în cazul unei rase pigmentate) permite un prim contact cu unii factori activi în procesul de formare a papilelor.

La rase pigmentate de găină (Plymouth etc.) se observă cum melanoblaștii proprii, difuzați în derm, venind din crestele ganglionare ale tubului neural și ajungînd în contact cu zonele de creștere intensă dermo-epidermică (zonele de manifestare și influență a unor factori de creștere), sînt antrenați de acești factori locali și participă în papile la procesul lor de creștere intensă. De altfel observăm aici și un epiteliotropism intens al melanoblaștilor, care sînt parcă atrași către epiteliul tegumentar, înspre care se îndreaptă din derm și din interiorul embrionului (unde îi găsim în preajama organelor axiale, M. D e l e a n u). O dată ajunși în contact cu epiteliul ectodermic, melanoblaștii pătrund în spațiile intercelulare ale epiteliului epidermic.

Celulele imigrate — melanoblaștii — se arată deci sensibile la influența unor factori locali de creștere. Melanoblaștii care se află însă alături de zonele dermo-epidermice, în tegumentul interpapilar, își păstrează, spre deosebire de cei ajunși în sfera de influență a papilelor, ritmul lor lent de creștere.

Stimulul de creștere și multiplicare, existent în papilă, s-a transmis deci melanoblaștilor. Zona de influență a acestui stimul rămîne însă strict locală, în cuprinsul primordiilor papilelor, stimulii nefiind legați de un factor umoral, capabil să difuzeze la distanță. Acest lucru reiese din următoarea experiență complementară.

Se implantează, în tegumentul embrionului de 3 zile de incubație, tegumentul unui alt embrion cu 4—5 zile mai înaintat, de aceeași sau de altă rasă (se păstrează corespondența topografică între locul de origine al implantului și locul de implantare). În asemenea

[1]) Complex embrionar = constituenții embrionului împreună cu factorii mediului său apropiat și îndepărtat cu care dezvoltă interacțiuni.

condiții putem face constant observația (pe care o considerăm importantă) că implantul își păstrează morfologie un timp îndelungat avansul său ontogenetic față de gazdă, în care este totuși integrat umoral și nervos. Abia spre sfîrșitul perioadei de incubație, avansul ontogenetic dispare.

Tegumentul gazdei nu manifestă nici un fel de spor de creștere în jurul implantului ontogenetic avansat, deci nu beneficiază de vreun factor de creștere care ar indica o difuziune în vecinătate a unui agent umoral, venind din grefă (fig. 287).

Pe baza acestor observații putem afirma că „factorii de creștere" din mugurii dermo-epidermici nu difuzează în afară, acționează însă asupra melanoblaștilor „imigrați", ajunși în cuprinsul primordiilor papilei.

Acest lucru devine și mai evident dacă ne servim de o *heterogrefă difuzoare de melanoblaști*.

Ne putem servi de grefe de tegument aparținînd unor rase diferit colorate, implantînd embrionilor Leghorn, de exemplu, tegumentul embrionar al rasei Plymouth, Rhode Island, de fazan etc.

Redăm observația tipică a comportării unei grefe heterospecifice de tegument embrionar (Plymouth sau Rhode) introdusă în tegumentul portgrefonului Leghorn (fig. 288, 289, 290, 291 și 292).

Se transplantează după matoda descrisă anterior tegumentul regiunii dorsale a embrionului de găină Plymouth sau Rhode Island ajuns la vîrsta de 8 zile de incubație pe regiunea dorsală a embrionului Leghorn de 3 zile de incubație.

Folosim donatorul de tegument în vîrstă de 8 zile deoarece în acest moment se formează papilele penelor și se intensifică formarea pigmentului raselor colorate și că ziua a opta de dezvoltare marchează la embrionul de găină o schimbare radicală a metabolismului (N e e d h a m). În felul acesta, transplantul nostru reprezintă stadiul inițial de dezvoltare a unui organ, și anume a penei embrionare, iar ambianța cutanată a portgrefonului, care primește transplantul, reprezintă organul omolog (heterorasial), însă într-un stadiu de dezvoltare mai înapoiat.

Avansul ontogenetic al grefonului asupra portgrefonului este astfel de 5 zile.

Tegumentul pigmentat al rasei Plymouth diferențiase, în momentul prelevării lui ca transplant, melanoblaști și centrele de diferențiere ale papilelor penelor.

Observînd transplantul în primele 2 zile după operație, se remarcă numai o migrare a colorantului vital folosit, din portgrefon în grefon, efect al proceselor de necrobioză care se petrec în grefon, (țesuturile necrobiotice sînt avide de coloranți vitali.) În a treia zi după transplantare se observă că mugurii papilelor grefonului sînt irigați din partea gazdei prin pătrunderea capilarelor și că au început să crească. Patru zile după implantare, penele implantului Plymouth au crescut mult și prezintă o intensă pigmentare, conform originii lor. Ele își păstrează avansul ontogenetic de 5 zile față de gazdă. Circulația în capilare este acum intensă în aceste „pene" embrionare. Se pot observa uneori tulburări circulatoare, uneori infarcte hemoragice cu deformări veziculoase și chistice ale penelor implantului.

În mod constant se observă în această perioadă o difuziune de celule pigmentare, cunoscută în literatură, celule care vin din transplant și înaintează în tegumentul portgrefonului. Migrația se face în mezenchimul subepidermic al gazdei.

Cinci zile după transplantare, embrionul gazdă Leghorn ajunge la rîndul său la momentul formării mugurilor fanerelor proprii. Celulele pigmentare difuzate din grefă imigrează acum în axele conjunctivo-vasculare ale papilelor tinere — în mod normal nepig-

mentate — ale portgrefonului Leghorn și în felul acesta se obține o zonă tegumentară întinsă a gazdei, care prezintă o pigmentare neagră de tip Plymouth, situată de jur împrejurul transplantului (fig. 289, 290, 292 și 298).

A luat naștere un organ hibrid, format din elementele gazdei Leghorn și din elementele imigrate din implantul aparținînd rasei Plymouth.

Și grefele heterospecifice (fazan etc.) difuzează melanoblaștii lor cu ușurință în tegumentul embrionului de găină.

În experiențele descrise pînă acum, melanoblaștii, ușor de urmărit prin colorația lor, sînt nu numai simpli imigranți în zonele de creștere dermo-epidermice, dar și imigranți proveniți dintr-un organism embrionar de altă rasă (sau chiar de altă specie).

Difuziunea melanoblaștilor dintr-o heterogrefă — fapt bine cunoscut în literatură — poate fi urmărită pas cu pas prin observația vitală (fereastra tăiată în coaja oului). Multiplicarea rapidă a melanoblaștilor ajunși în dreptul papilelor relevă morfologic intensitatea și localizarea zonelor de influență a unor factori de creștere.

Și în cazul heterorasial se observă o mai slabă înmulțire a melanoblaștilor în tegumentul dintre papile și epiteliotropismul despre care a fost vorba mai înainte. Într-adevăr, și aci melanoblaștii heterospecifici sînt atrași de epiteliul ectodermic tegumentar și pătrund în interstițiile dintre celulele epiteliale ale acestuia. În contact cu celulele epiteliale, melanoblaștii le cedează granule de pigment, care se detașează din corpul lor (vezi capitolul precedent, „Fagocitoza melanoblaștilor").

Influența factorilor de creștere descriși asupra melanoblaștilor difuzați se intensifică paralel cu dezvoltarea papilelor, fapt care reiese cu claritate din următoarele experiențe :

În tegumentul unui embrion Plymouth, rasă pigmentată, de 3 zile de incubație, se implantează un fragment de tegument dorsal al unui embrion aparținînd rasei Leghorn de 8 zile de incubație. Melanoblaștii gazdei mai tinere, care apar abia spre sfîrșitul celei de a cincea zile de incubație, încă relativ puțin dens repartizați, difuzează în grefonul ontogenetic mai înaintat, unde se multiplică cu o viteză surprinzătoare. Viteza de multiplicare a melanoblaștilor gazdei (Plymouth, care de data aceasta invadează grefonul normal nepigmentat) în contact cu papilele grefei, devine mult mai mare decît în propriul lor organism de origine (fig. 293 și 297).

Papilele Leghorn implantate, care în primele zile după transplantare, urmărite prin observație vitală, s-au menținut nepigmentate conform originii lor, se înnegresc acum brusc în 24 de ore prin înmulțirea furtunoasă a melanoblaștilor Plymouth, contrastînd cu însăși pielea gazdei, macroscopic încă necolorată.

Din această experiență trebuie să tragem concluzia că factorii de creștere sînt mult mai activi în implantul ontogenetic mai avansat, producînd, în acest caz, efectul descris asupra melanoblaștilor difuzați dintr-o gazdă mai tînără (atracția celulelor spre un centru „excitat").

Pentru dezvoltarea în bune condiții a implantelor de tegument este absolut necesară stabilirea legăturii cu circulația sanguină a gazdei. Papilele implantelor heterorasiale sau heterospecifice nu mai cresc dacă nu sînt invadate de anse capilare, care provin din organismul gazdei. Din această cauză, transplantarea tegumentului embrionar este mai grea în fazele înaintate ale dezvoltării papilelor, cînd necesitățile de irigație sanguină sînt mai mari.

Două experiențe ajutătoare, făcute împreună cu M. Deleanu, pot aduce lămuriri în această problemă.

Un fragment de tegument dorsal al embrionului Plymouth de 7 zile de incubație (deci la apariția primordiilor papilelor) este introdus în cavitatea amniotică a unui embrion de 4 zile de incubație, aparținînd rasei Leghorn. Prin observația vitală se poate vedea cum fragmentul, plutind liber în lichidul amniotic, se dezvoltă mai departe. Papilele cresc, melanoblaștii se multiplică. În aceste condiții experimentale, fragmentul de tegument, introdus în cavitatea amniotică, nu are posibilitatea să stabilească vreo legătură cu circulația sanguină a gazdei. Dezvoltarea fragmentului continuă circa 4 zile în aceste condiții de cultură în lichidul amniotic și deci în cavitatea amniotică a unui embrion viu, în care acest lichid se reînnoiește continuu, primind substanțe excretate la nivelul tegumentului gazdei. După acest termen de 4 zile se observă de obicei o necroză bruscă a tegumentului introdus.

Fără aprovizionare cu sînge, fără inervație, cultura consumă o anumită rezervă metabolică, acumulată încă în timpul interacțiunii nestingherite cu totalitatea organismului din care a fost separată, după consumarea căreia urmează moartea fragmentului de tegument.

În legătură cu această experiență remarcăm că C. R î m n i c e a n u a descoperit, recent, o importantă încărcare cu glicogen a stratului bazal epidermic din mugurii embrionari ai fanerelor. Explantarea unui fragment de tegument embrionar în lichidul subembrionar permite în anumite cazuri continuarea creșterii vîrfurilor papilelor. Uneori apar însă fenomene de creștere anormală sau se instalează creșterea histotipică cu pierderea caracterului de organ.

Nu toate categoriile de melanoblaști prezintă aceeași reactivitate față de factorii de creștere din papilele tegumentare.

Cercetări amănunțite, prin care verificăm, împreună cu M. D e l e a n u, observațiile anterioare ale lui H. L. H a m i l t o n, făcute în culturi de țesuturi, ne-au confirmat existența constantă de promelanoblaști, distribuiți în mod tipic în anumite regiuni ale tegumentului embrionar al rasei Leghorn alb (dominant). Acești promelanoblaști se pot transforma chiar în melanoblaști în proporții care variază la diferite linii, persistînd, ca atare, un scurt timp din perioada preeclozională, după care dispar.

Noi considerăm acești melanoblaști rari și efemeri ca pe o recapitulare embrionară a unui caracter filogenetic mai vechi, care nu mai apare la individul adult actual (fig. 294).

S-ar putea discuta și efectul dominanței culorii „albe" tipice la rasa Leghorn, cu care lucrăm și care s-ar manifesta cu toată tăria numai în faze ontogenetice embrionare mai înaintate, și nu la începutul ei.

Spre deosebire de melanoblaștii raselor actualmente pigmentate, acești melanoblaști rudimentari, filogenetic slăbiți (comparabili cu anumite organe embrionare trecătoare), nu participă la creșterea activă din papilă, arătîndu-se numai în foarte mică măsură sensibili la acțiunea factorilor de creștere. Iată o experiență ajutătoare în legătură cu acest fenomen.

Se excizează tegumentul embrionar al embrionului de găină Leghorn de 7 zile de incubație și se transplantează în locul discului embrionar, în prealabil îndepărtat, al unui ou de 50 de ore de incubație. Gălbenușul cu cavitatea subembrionară și resturile ariei vasculare constituie acum mediul cu care tegumentul (aflîndu-se în locul embrionului) stabilește legături și continuă să crească și să se dezvolte (această nouă metodă de cultură „în ou" în locul discului embrionar va putea fi folosită și pentru alte cercetări) (fig. 295).

În aceste condiții de creștere, un număr de promelanoblaști Leghorn se transformă în melanoblaști, probabil în condițiile lipsei circulației sanguine, necesare în mod normal

acestui stadiu de dezvoltare a tegumentului. După apariția melaninei în acești promelanoblaști se retransplantează tegumentul pe corpul unui embrion Leghorn de 3 zile, unde acesta se vascularizează (din partea gazdei) și își continuă dezvoltarea. Melanoblaștii apăruți în condițiile creșterii pe ou dispar acum rapid.

Din aceste observații tragem concluzia că „factorii de creștere" trebuie să acționeze asupra unor elemente sensibile, capabile să reacționeze, și că melanoblaștii pot pierde această reactivitate în fața factorilor de creștere din zonele dermo-epidermice. Desigur că aici ar putea acționa substanțe (factori) umorale melanogenetice.

A privi însă „factorii activi", în fenomenele analizate pînă acum, ca strict locali sau chiar strict intrinseci, nu numai ca efecte ale lor, ci și ca o condiționare totală, ar fi o greșeală conformă cu unele concepții extremiste a așa-zisei „mecanici a dezvoltării". Trebuie însă subliniat aici că specificul „mecanicii dezvoltării" nu rezidă numai într-un complex de tehnici de cercetare, și ea nu trebuie confundată cu aceste tehnici. „Mecanica dezvoltării" tradițională nu este un grup de metode și tehnici, ci o concepție, care a fost dominată mult timp de modul de gîndire mecanicist [1]). Rezultatele obținute prin folosirea diferitelor metode și tehnici pot fi însă interpretate totdeauna materialist-dialectic, deci corect științific, ținîndu-se seama de interacțiunea în continuă dezvoltare a tuturor părților complexului embrionar, de istoria lor filogenetică, de rolul factorilor ecologici etc.

HETEROGREFE DIFUZOARE DE PROMELANOBLAȘTI

În domeniul cercetărilor noastre, acest lucru devine evident cînd trecem de la heterogrefe interrasiale sau interspecifice la heterogrefe la care donatorul, respectiv primitorul, diferă de partenerul său (gazdă sau grefă) prin tipul lui de dezvoltare. Într-adevăr, speciile nidifuge și nidicole diferă între ele prin ritmul și durata succesiunii treptelor ontogenetice embrionare. Cercetînd comportarea heterogrefelor embrionare între specii nidifuge și nidicole (cu ritmul rapid, respectiv lent al diferențierii preeclozionale), experiențe începute în colaborare cu acad. V. D. Mîrza, se pot observa fapte noi, care nu apar în cazul partenerilor cu același tip de dezvoltare sau rămîn inexplicabile dacă la alegerea partenerilor se ține seama numai de diferențele de rasă și specie, și nu și de cele legate de tipul de dezvoltare.

Acest gen de cercetări ne-a permis ca să evidențiem împreună cu M. Deleanu, existența unor însușiri biologice ale tegumentului care demonstrează determinarea timpurie a proceselor locale de către modul de dezvoltare a complexului embrionar luat ca un întreg istoric determinat.

Într-adevăr, existența unei faze aproape larvare, intercalată între ecloziune și atingerea maturității (imaturitatea posteclozională), apare nu numai sub aspectul unei încetiniri a diferențierii neuro-umorale, ci, după cum se va vedea, imprimă tegumentului, și probabil tuturor părților organismului, însușiri caracteristice biochimice, metabolice, chiar în perioade precoce ontogenetice. Puii păsărilor nidante, spre deosebire de cele nidifuge, sînt protejați de cuib și de prezența părinților. Coloritul lor, caracteristic speciei sau rasei, adaptat la mediu, nu trebuie să apară încă în această perioadă (vezi Ch. Darwin, „Originea omului și selecția sexuală la păsări, culoarea și construcția cuiburilor"). În schimb, la părinți, instinctele de îngrijire a puilor trebuie să se dezvolte foarte mult (construcția de cuiburi, hrănirea și protecția puilor etc.).

---

[1]) Fără a nega că concepția mecanicistă poate determina alegerea unui anumit tip de tehnici.

„Tinerețea" prelungită sub îngrijirea generației parentale permite uneori dobîndirea unui număr mai mare de reflexe condiționate și uneori a unei protecții mai eficace împotriva dușmanilor decît la nidifugii după ecloziune. La apariția acestui tip de dezvoltare, care reprezintă o adaptare la anumite condiții de mediu, participarea sistemului nervos și neuro-umoral a jucat un rol important.

Implantarea tegumentului embrionar aparținînd unei specii nidicole (cu diferențiere înceată preeclozională) de pildă a porumbelului de rasă colorată, în tegumentul embrionar al embrionului de găină Leghorn (nidifug), ne dă un rezultat surprinzător :

În grefa care este irigată și inervată de gazda Leghorn [1]), cu rapidă diferențiere preeclozională, transformarea promelanoblaștilor în melanoblaști maturi, care există în mare cantitate în tegumentul embrionar de porumbel, se face tot atît de încet și numai în puține celule ca și în condițiile normale [2]) în organismul embrionar de origine. În schimb are loc o difuzare de promelanoblaști din grefă în tegumentul gazdei, unde aceștia se melanizează intens.

Această grefă care, deși integrată nervos și umoral în gazda Leghorn, nu-și transformă promelanoblaștii în melanoblaști, se arată a fi un energic difuzor de promelanoblaști înspre tegumentul gazdei. Avem chiar impresia că grefa este activ părăsită de promelanoblaști, care parcă sînt atrași de țesuturile gazdei. Gazda (Leghorn) este nu numai un acceptor de promelanoblaști, dar în acest nou mediu (și numai aici) are loc și o rapidă transformare a promelanoblaștilor în melanoblaști. Tegumentul Leghorn se arată deci a fi nu numai un acceptor, ci și un accelerator al dezvoltării (maturării) promelanoblaștilor de porumbel (fig. 296).

Promelanoblaștii rămași în fragmentul de tegument implantat, care se dezvoltă și se diferențiază mai departe în noul lor mediu, nu se arată influențați nici de factori umorali aduși de sîngele gazdei Leghorn, care pătrunde în implant prin capilare neoformate, nici de acțiunea terminațiilor nervoase (prin mediatori) ale gazdei Leghorn, care invadează în mod constant implantul (inervația heterogrefelor noastre embrionare de către gazdă o observăm cu regularitate; vezi și disertația de candidat în științe medicale a lui M. D e l e a n u).

Influența gazdei se manifestă, pe de o parte, în implant, prin atracția promelanoblaștilor înspre tegumentul ei, însă, înmulțirea și maturarea celulelor pigmentare nu capătă în implant, ritmul imprimat de gazdă, cu toată integrarea neuro-umorală. Maturarea se produce numai, cum s-a spus, la promelanoblaștii emigrați, în intim contact cu elementele dermo-epidermice ale gazdei.

Ceea ce apare deci ca un fapt nou față de constatările făcute în experiențele noastre precedente cu implantarea tegumentului heterorasial sau heterospecific, însă între specii, respectiv rase, avînd același tip de dezvoltare (izoritmice sau izocronice) este grăbirea melanizării în gazdă a promelanoblaștilor, care în locul lor de origine s-ar fi melanizat mult mai tîrziu, deci o influență netă a gazdei asupra elementelor provenite din grefă, realizînd o adevărată „grăbire ontogenetică experimentală", care contrastează cu insensibilitatea promelanoblaștilor rămași în implant, față de factorii neuro-umorali ai gazdei.

---

[1]) Inervația heterogrefelor de către gazdă a fost verificată de M. D e l e a n u.

[2]) Puful embrionar de porumbel este și la rasele colorate nepigmentat. Pigmentul penajului apare aici tîrziu după ecloziune, spre deosebire de speciile nidifuge (găină), la care pigmentul apare vizibil începînd cu a șasea și a șaptea zi de incubație.

Factorul neuro-umoral fiind acum identic pentru gazdă și implant, comportarea diferită a promelanoblaștilor rămași și emigrați nu este explicabilă decît prin diferențele care există între însuși tegumentul speciei nidante și al speciei nidifuge (fig. 299 și 300).

Tegumentul speciei nidifuge se manifestă ca un acceptator de promelanoblaști, pe cînd tegumentul speciei nidicole se arată a fi un mediu neprielnic maturării promelanoblaștilor sau primirii melanoblaștilor maturi în această perioadă ontogenetică.

Următoarele experiențe ajutătoare, făcute de M. Deleanu, vor evidenția și mai bine această comportare:

Implantarea tegumentului embrionar de porumbel (7 zile de incubație) într-o ambianță bogată în melanoblaști, de exemplu în tegumentul embrionar Plymouth de 3 zile de incubație, ne arată că, cu toată integrarea neuro-umorală a implantului, nu are loc nici o imigrare de melanoblaști din gazdă aici, comportare contrară cu ceea ce s-a descris la implantul de tegument Leghorn pe gazda Plymouth (descrisă mai sus).

Tegumentul embrionar de porumbel nu acceptă deci, chiar avînd un avans ontogenetic față de gazdă, melanoblaștii embrionului de găină.

Transplantarea tegumentului embrionului rasei pigmentate de găină Plymouth, ontogenetic mai avansate, pe embrionul de porumbel, ne arată că în acest caz melanoblaștii Plymouth nu difuzează aproape de loc în această gazdă, comportare care contrastează net cu ceea ce am văzut că se întîmplă în cazul implantării tegumentului Plymouth pe o gazdă Leghorn sau o gazdă Rhode Island (fig. 301 și 302).

Și mai curios este faptul că embrionul de porumbel nu acceptă nici melanoblaștii maturi proprii, după cum reiese din următoarea experiență (citată în disertația de candidat în științe medicale a lui M. Deleanu): după ce se obține difuzarea melanoblaștilor de porumbel în tegumentul gazdei Leghorn, acest tegument Leghorn, (conținînd deci promelanoblaști de porumbel deja melanizați) este excizat și reimplantat pe embrionul de porumbel. În aceste condiții experimentale se constată dezvoltarea și creșterea a tegumentului Leghorn împreună cu melanoblaștii săi de porumbel pe embrionul de porumbel, însă nu se poate observa difuziunea melanoblaștilor de porumbel din grefă în tegumentul gazdei porumbel.

Folosirea criteriului „nidicol-nidifug" în alegerea partenerilor la transplantarea heterospecifică (deci a unei diferențe a tipului de dezvoltare) ne permite, după cum s-a văzut, observarea unor diferențe, probabil biochimice, între tegumentele acestor două tipuri.

Ne-am întrebat dacă melanoblaștii pe care-i observăm în tegumentul gazdei, de jur împrejurul unui implant de tegument heterorasial sau heterospecific, provin într-adevăr din implant, deci dacă sînt imigrați din implant în gazdă sau sînt produse ale țesuturilor gazdei sub influența unor substanțe excitante provenite din grefă.

Din literatură sînt cunoscute numeroase cazuri de apariție a melaninei în apropierea unor procese patologice. Asemenea fenomene au fost descrise la diferite specii animale și la om. Pentru a rezolva această problemă am întreprins o serie de cercetări experimentale, care vor fi relatate pe scurt în cele ce urmează.

Știind că la papagalul *Melopsitacus ondulatus* anumiți melanoblaști din tegumentul embrionar diferă ca formă de melanoblaștii galinaceelor, am transplantat tegumentul embrionar, aparținînd speciei *Melopsitacus ondulatus*, pe o gazdă Leghorn de 3 zile incubație. Și în acest caz am putut observa fenomenul descris cu ocazia transplantării tegumentului de porumbel pe embrionul Leghorn (fig. 303 și 304).

Papilele implantului au stabilit o legătură cu circulația gazdei și au început să crească și să se dezvolte, rămînînd însă nepigmentate. De jur împrejurul implantului, asemănător

cu ceea ce s-a putut observa cu ocazia implantului tegumentului de porumbel, a apărut în dermul și în axele conjunctivo-vasculare ale papilelor gazdei o intensă pigmentație prin prezența unor mase mari de melanoblaști absolut tipic dispuși în țesuturile gazdei, prezentînd însă caracterele melanoblaștilor de papagal. Acești melanoblaști, spre deosebire de cei ai galinaceelor și porumbeilor, sînt grosolani, avînd numai scurte prelungiri puțin ramificate sau nu prezintă de loc prelungiri (fig. 304).

Deosebindu-se în felul acesta morfologic de melanoblaștii speciei gazdă, ne întăresc convingerea provenienței lor din implant (fig. 303 și 304 și 305).

Împreună cu colaboratorul meu M. D e l e a n u m-am putut convinge de realitatea provenienței melanoblaștilor difuzați în gazdă din implant și prin următoarea experiență : folosind ca implant și ca gazdă rase diferit colorate de găină, de pildă gazdă Rhode Island, implant Plymouth, am putut constata că totdeauna melanoblaștii difuzați în țesuturile gazdei prezentau culoarea pigmentului corespunzător originii lor, contrastînd net cu pigmentul autohton al gazdei.

Folosind această tehnică M. D e l e a n u arată în dizertația sa de candidat că melanoblaștii emigrați dintr-un implant aparținînd rasei Plymouth, difuzați într-o gazdă Rhode Island, se așază de predilecție la rădăcinile (coapsa) membrelor inferioare, după ce au străbătut, fără să se statornicească, regiunile laterale ale tegumentului dorsal (implantul făcîndu-se după metoda mielorahischizisului).

În cazurile în care am folosit drept implant tegumentul embrionului de fazan și ca gazdă embrionul Leghorn, melanoblaștii difuzați din implant în gazdă prezintă o pigmentație conform coloritului rasei de fazan folosite. Este interesant că, în tegumentul gazdei, melanoblaștii difuzați reproduc un desen compus din elemente brune și negricioase, care are o oarecare asemănare cu desenul puilor de fazan.

Experiențele citate ne întăresc convingerea că pigmentația care se dezvoltă în urma implantării tegumentului embrionar heterorasial sau heterospecific în gazde embrionare provine realmente din grefă și nu este un produs al gazdei.

INFLUENȚA INERVAȚIEI ASUPRA FACTORILOR DE CREȘTERE ȘI DIFERENȚIERE ÎN TEGUMENTUL EMBRIONAR

În dermul embrionului se dezvoltă o rețea nervoasă bogată, (îndeosebi în preajma diferențierii papilelor) din care pătrunde cîte un mănunchi de fibre în fiecare mugure dermoepidermic.

Transplantînd tegumentele embrionare în faza apariției primordiilor papilelor (7—8 zile de incubație) pe membrana corion-alantoidiană a unui embrion de aceeași rasă (sau de altă rasă) se poate constata ușor (cercetări făcute cu M. D e l e a n u) că aceste papile cresc mai departe și se diferențiază. Se realizează astfel o adevărată denervare a implantelor, corion-alantoida nefiind inervată. În dermul transplantat se dezvoltă țesut gras, fibre musculare netede etc., toate acestea, fără acțiunea directă a terminațiilor nervoase, inexistente în condițiile de creștere pe corion-alantoidă. Aici influența sistemului nervos al corpului embrionului se poate manifesta numai prin intermediul unor substanțe care sosesc pe cale sanguină.

Dacă repetăm experiența cu implantarea tegumentului de porumbel lîngă tegumentul Leghorn, excluzînd însă inervația acestuia prin implantare pe corion-alantoidă, nici un fel de transformare a promelanoblaștilor nu se mai produce în aceste condiții. O experiență de control, cu afrontarea tegumentului Leghorn și Plymouth pe corion-alantoidă, arată

totuși posibilitatea difuzării melanoblaștilor maturi în condițiile creșterii pe corion-alantoidă a unui donator de pigment lîngă un acceptor cu tip de dezvoltare izocronică (fig. 306, 307, 308, 309, 310 și 313).

Comparația comportării unui organ sau țesut embrionar în condițiile transplantării lui pe corpul embrionului gazdă, pe membrana corion-alantoidiană și în cultura de țesut — metoda „în trei trepte" — ne-a dat, aplicată în problema care ne interesează în aceste cercetări, — rezultate utilizabile.

Metoda permite — prin excluderea succesivă a cîte unui grup de factori la trecerea de la o treaptă experimentală la cea următoare — analiza unor procese ontogenetice embrionare.

Aplicînd metoda la studiul heterogrefelor difuzoare de promelanoblaști, am completat observațiile noastre descrise pînă acum, privind grefele de tegument făcute pe corpul embrionului de găină și pe membrana corion-alantoidiană, cu un studiu al comportării tegumentului embrionar de porumbel și de găină în cultură de țesut.

Împreună cu M. D e l e a n u am cultivat tegumentul embrionului de găină rasa Plymouth, al embrionului de porumbel (rasa colorată) și tegumentul embrionului de porumbel afrontat cu cel de găină (Leghorn). Ca mediu de cultură au servit plasma heparinată 1 : 20 000 de găină rasa Leghorn și extractul embrionar obținut din embrionul de găină rasa Leghorn de 8 zile de incubație.

Tegumentul destinat a fi cultivat a fost recoltat în a șaptea sau a opta zi de incubație, cînd începe dezvoltarea papilelor, iar la rasa Plymouth, cea a pigmentului. Toate explantele au fost examinate microscopic înaintea introducerii lor în gazde.

Rezultate :

1. a) Cultura de țesut de tegument embrionar de găină rasa Plymouth, recoltată în a cincea zi de incubație (înaintea apariției papilelor și pigmentului), a arătat apariția melanoblaștilor în explant în a treia zi de cultură, cu migrarea și multiplicarea melanoblaștilor în zona de creștere a culturii (fig. 312). b) Cultura de țesut a tegumentului embrionar de găină rasa pigmentată (Plymouth) recoltată în a șaptea sau a opta zi, cînd tegumentul prezintă papile și pigment, a arătat de asemenea migrarea melanoblaștilor în zona de creștere și multiplicarea lor în această zonă.

2. Cultura tegumentului embrionului de porumbel, rasa pigmentată, în mediu cu plasmă de găină, a arătat o dezvoltare destul de viguroasă a culturii, fără dezvoltarea elementelor pigmentate (chiar după mai multe repicări).

3. Prin afrontarea în aceeași cultură (în plasmă de găină Leghorn și extract de embrion Leghorn) a tegumentului embrionar de porumbel, rasa pigmentată, de 7 zile, și a tegumentului embrionar de găină rasa nepigmentată (Leghorn) de 7—8 zile, se obține o zonă de creștere mixtă, formată din elementele ambelor tegumente. Nici în condițiile acestei culturi nu apar elemente pigmentate ale tegumentului de porumbel (fig. 311).

Din aceste trei serii de experiențe putem trage următoarea concluzie : în principiu, elementele pigmentate existente migrează în zona de creștere și se pot multiplica acolo. Tegumentul embrionului de găină, rasa pigmentată (Plymouth), își poate dezvolta pigmentul în condițiile culturii de țesut, însă tegumentul embrionului de porumbel, rasa pigmentată, în condițiile explantării și creșterii în plasmă heparinată de găină și extract embrionar de găină și chiar în interacțiune cu celulele vii ale zonei de creștere a unei culturi de tegument de găină, nu este capabil să diferențieze pigmentul său.

Din toate experiențele relatate (cultura pe corpul embrionului, pe corion-alantoidă și în explantare) rezultă deci că la efectul de melanogeneză precoce descris colaborează

cel puțin trei factori : însușirile specifice tipului de ontogeneză ale epidermului și dermului, reactivitatea promelanoblaștilor și acțiunea terminațiilor nervoase.

Astfel, însușirile generale filogenetic întărite — cum sînt caracterele nidicolelor și nidifugelor — se manifestă pînă în detalii ale organizației morfo-funcționale a organismului embrionar, cuprinzînd și fine amănunte locale.

Este interesant că melanizarea precoce a promelanoblaștilor de porumbel nu se manifestă în tegumentul gazdei (găină) decît începînd cu a 11-a sau a 12-a zi de incubație, moment care s-a dovedit, cu ocazia experiențelor asupra dezvoltării sistemului nervos, că a marcat începutul unei eficacități trofice mai intensive a terminațiilor nervoase embrionare. Ne-am putea gîndi la o accentuare a eficacității troficitații terminațiilor nervoase (mediatorii), legate de gradul de maturitate al sistemului endocrin.

Rezultatele experiențelor descrise ne permit să distingem, la partenerii heterotransplantărilor (grefe și gazde), o serie de „calități". Astfel putem vorbi de un partener „difuzor", de unul „acceptor", respectiv „neacceptor" de elemente celulare și de un „accelerator" de procese ontogenetice.

Aceste calități descrise de noi, deocamdată în condițiile experimentale expuse, aruncă poate o lumină asupra unor posibilități de întrebuințare a heterogrefelor „de dirijare" în viitor.

Ce denumire putem da tegumentului constituit din elemente heterogene, aparținînd la două organisme de rasă sau specie diferită? Se știe că asemenea țesuturi sau organe au fost denumite „himere de altoire" (Winkler-Bauer) și concepute ca amestecuri heterogene în care conviețuiesc componenți de origine diferită, fără să se influențeze reciproc.

Nu putem crede că în experiențele noastre au difuzat din implante numai celule pigmentare lesne observabile. Este foarte verosimil că participă și alte elemente — celule și structuri necelulare — la schimbul de substanțe dintre grefă și gazdă.

Nu ne putem închipui că celulele melanoblastice care cresc și se înmulțesc în noul lor mediu s-ar comporta acolo ca niște corpuri străine inerte. Ele nu numai că asimilează mediul străin, prin creștere și înmulțire, dar îi cedează și substanțe care rezultă din metabolismul lor. Felul cum se asimilează mediul nou sau cum se intercalează elemente heterospecifice în structura proprie va face obiectul altor cercetări.

Există de altfel un număr important de cercetări asupra influențelor reciproce pe care le suferă altoiurile și portaltoiurile vegetale și animale, la care se obțin adevărate hibridări vegetative. În asemenea cazuri s-au descris modificări cromozomiale, tulburări în reducerea cromatică în timpul meiozei, asemănătoare cu cele care se observă la hibridarea sexuată îndepărtată etc. Credem în consecință că denumirea corectă a țesuturilor cu componență heterogenă, obținute în experiențele descrise, este cea de „țesuturi vegetativ hibride".

Toate cercetările relatate au fost efectuate pe rase riguros pure, îndelung observate de noi. În experiențe viitoare vom examina comportarea implantelor heterospecifice și heterorasiale, aparținînd celor două tipuri de dezvoltare și pe gazde sexual hibride.



După ce Du Shane a evidențiat originea melanoblaștilor păsărilor din crestele neurale ale tubului neural, de unde emigrează în dermul și epidermul tegumentului, B.H. Willier și M.E. Rowles au întreprins studii întinse asupra dezvoltării primordiilor penelor embrionare, a comportării melanoblaștilor în embrion și în timpul vieții postecl o-

zionale cu ocazia regenerării penelor în urma năpîrlirii, descriind migrările și difuziunea celulelor pigmentare în tegument. W i l l i e r și R o w l e s au executat și grefe embrionare folosind ca material crestele ganglionare (promelanoblaști) implantate la baza mugurilor membrelor sau în cavitatea celomică. De asemenea au transplantat primordiile membrelor embrionilor de la rase pigmentate în celomul raselor nepigmentate, constatînd dezvoltarea celulelor pigmentare în cazul cînd promelanoblaștii proveniți din creasta ganglionară au avut timp să pătrundă în transplant, înaintea prelevării lui de la locul de origine.

Autorii citați au studiat în mod deosebit influența hormonilor asupra melanogenezei în timpul regenerării penelor după năpîrlire (deci în viața posteclozională). W i l l i e r ajunge la concluzia că coloritul păsării este rezultatul interacțiunii dintre melanoblaști — migratori — și papila penei. După W i l l i e r, reactivitatea melanoblaștilor și a celorlalți componenți ai papilei (care reprezintă un adevărat „organizator") hotărăște răspunsul melanoblaștilor la acțiunea unui hormon special. Hormonii acționează ca reglatori ai expresiei potențialităților inerente (intrinsece) ale diferiților componenți ai papilei penei. Aceste „posibilități inerente" sînt interpretate de W i l l i e r și colaboratorii lui ca expresie a constituției genice a melanoblaștilor și celorlalte elemente. Reactivitatea melanoblastului la influențele hormonale ar depinde în ultima linie, după W i l l i e r, de constituția sa genică.

Cu concluzia acestor autori, după care pigmentarea rezultă din interacțiunea dintre melanoblast și papilă — cu toate că formularea ne pare incompletă — nu putem decît să fim de acord. Concluziile noastre diferă însă în privința celorlalte afirmații.

În experiențele noastre ne-am folosit de o tehnică diferită de cea a lui W i l l i e r și a școlii sale. Noi nu am transplantat materialul crestei ganglionare, în care, indiferent de rasă, specie sau tip de dezvoltare, celulele formatoare de pigment se găsesc totdeauna în faza de promelanoblaști. Noi am folosit ca material de grefă tegumentul embrionar în momentul cînd acesta conține fie melanoblaști formați (la nidifuge), fie promelanoblaști (la nidicole).

Acest tegument îl implantăm homeotopic în gazdă, în locul corespunzător situației lui în organismul donator (de origine), și anume pe tubul neural al gazdei, chiar în calea difuziunii normale a promelanoblaștilor. Această tehnică permite comparația și evidențierea mai directă a finelor diferențe care există în tegumentele embrionare la cele două tipuri de dezvoltare (nidicol și nidifug), de care cercetările lui W i l l i e r, R o w l e s, nu țin seama. Cum s-a văzut, aceste diferențe constau — în perioada ontogenetică în care am lucrat — în particularități ale însușirilor biochimice ale tegumentului și ale acțiunii terminațiilor nervoase.

Spre deosebire de tehnicile întrebuințate de W i l l i e r și colaboratorii săi, metoda noastră de comparație a comportării grefelor pe corpul embrionului și pe corion-alantoidă au adus lămuriri suplimentare importante.

După concepția lui W i l l i e r, în condițiile creșterii pe corion-alantoidă, tegumentul de porumbel ar fi trebuit să se melanizeze în urma acțiunii umorale a gazdei, exercitată pe calea curentului sanguin. Concepția lui E. W o l f f, după care alantoida ar fi un mediu „anhormonal", nu poate fi susținută, după părerea noastră. Dar tocmai acest lucru nu se întîmplă în realitate. Nici în contact cu tegumentul unui acceptor de melanoblaști nu se poate observa melanizarea promelanoblaștilor de porumbel crescînd pe corion-alantoidă. Melanizarea lor are loc numai pe corpul embrionului (și aci numai în corpul gazdei), deci în prezența terminațiilor nervoase și a factorului tegumentar local și, bineînțeles, în condițiile umorale date.

Categoriile de parteneri la transplantare, cu care lucrează Willier, sînt numai de rasă și de specie.

Willier nu cuprinde în tematica sa studiul comportării tipurilor diferite de dezvoltare. Or, aceste tipuri de dezvoltare, însumînd fiecare cîte un grup de specii, reprezintă efectul unei adaptări la mediu, filogenetic cîștigat, stînd deasupra unității speciei, înlăuntrul clasei. La statornicirea acestor adaptări la mediu, sistemul nervos a jucat un rol primordial, ceea ce se manifestă și în intervenția lui în melanogeneza embrionară actuală. Studiul rolului sistemului nervos lipsește de asemenea în lucrările lui Willier și colaboratori, lucrări de altfel bogate și foarte importante.

Luînd în considerație tipul de dezvoltare, particularitățile imprimate de acesta celor mai fine amănunte biochimice ale tegumentului depășesc cadrul caracterelor de specie, evidențiind efectul unei adaptări întrunind grupări supraspecifice.

Astfel apare că tegumentul nidifugilor este un acceptor și difuzor de melanoblaști, pe cînd cel al nidicolelor numai difuzor, nu și acceptor.

După Willier, promelanoblaștii grefați s-ar comporta totdeauna în noua ambianță conform originii lor. Afirmația este în realitate inexactă, dacă o considerăm din punctul de vedere al momentului melanizării, tardiv conform originii, precoce în noua ambianță pe corpul embrionului gazdei. Metodica noastră permite — în concordanță cu principiile miciuriniste — concluzia că amănuntul morfo-fiziologic (aici pigmentarea) se realizează totdeauna în ontogeneză ca un proces de dezvoltare a unei baze ereditare în prezența unor factori și condiții, și în interacțiune cu constituenții întregului complex embrionar.

Se verifică, de asemenea, concepția lui I. P. Pavlov asupra legăturii inervației cu metabolismul.

Nu există o transmitere mecanică de însușiri ereditare. Dacă celula melanoblastică poate asimila în noul ei mediu elemente specifice condițiilor originii ei, ea se va comporta conform cu această origine. Dacă însă este silită să introducă elemente care diferă, rezultatul va fi schimbat în ceea ce privește momentul apariției melanizării, posibilitatea de înmulțire și creștere etc. Astfel, constelația (variabilă de-a lungul ontogenezei) a factorilor în interacțiune determină realizarea amănuntelor.

Tipul de ontogeneză — în ultima linie un tip de metabolism — imprimă mai mult decît însușirile de specie particularitățile lui celor mai fine detalii ale organismului embrionar.

Fiecare pas ontogenetic rezultă din interacțiunea componenților prezenți în complexul embrionar.

BIBLIOGRAFIE

1. Barișnikov I. A., Sakpe M. G. i Pavlov E. F., *Vliianie materinskogo organizma na okrasku șersti potomstva krolikov v usloviah gomotransplantații iaicinikov*, Izv. Akad. Nauk SSSR, 1950, Seria biol., nr. 6.
2. Berezkina L. P., *Piatiletnii veghetativnii ghibrid aksolotlia i ego potomstvo*, Usp. sovrem. biol., 1955, t. XI, nr. 3 (2), p. 30.
3. Billingham R., Brent L. a. Medawar P., *Actively Acquired Tolerance of Foreign Cells*, Nature, 1953, t. 172, p. 602.
4. Billingham R., Medawar P. și Sparow N., *Actively Acquired Tolerance through Treatement of the Foetus (Mice, Chick Embryos) with Homologous Alive Cells*, Transplantation Bull., 1953, vol. 1, nr. 26, p. 926.

5. Boriaciok-Nijnik G. V., *Opitt po veghetativnoi ghibridizaţii jivotnih*, J. obşcei biol., 1951, nr. 4.
6. Bratanov K., *Veghetativnaia ghibridizaţia u ptiţ*, Izv. Akad. Nauk SSSR, seria biologhiia, 1951, nr. 1.
7. Danforth C. H., *Genetic and Metabolic Sex — Differences The Manifestation of a Sex Linked Trait Following Skin Transplation*, J. Heredity, 1939, t. 30, p. 178.
8. Darwin Ch., *La descendance de l'homme et la sélection sexuelle*, Paris, Ed. Schleicher, 1871.
9. Dorris F., *The Production of Pigment by Chick Neural Crests in Crafts to the 3 Day Limb Bud.*, J. Exp. Zool., 1939, nr. 80, p. 315.
10. Du-Shane G. F., *The Development of Pigment Cells in Vertebrates*, Byol. of Melanomes, New York, Ed, Acad. of Sciences, Sect. of Byol., 1948, p. 1.
11. Ferdinandov V. V., *Izîskanie metodov veghetativnoi ghibridizaţii jivotnih*, Usp. sovrem. biol., 1952, t. 34, nr. 2, p. 307.
12. Gluscenko I. E., *Importanţa hibridării vegetative pentru cunoaşterea eredităţii şi variabilităţii*, Bucureşti, Ed. Cartea rusă, 1950.
13. Hamilton H. L., *A Study of the Physiological Properties of Melanophores with Special Reference to their. Role in Feather Coloration*, Anat. Rec., 1940, t. 48, p. 525.
14. Haşek M., *Vegetativni hibridizace u zivocichu*, Praga, Ceho. Acad. Ved., 1953.
15. Kurbatov A. D., *Izmenenie nasledstvennosti i povişenie jiznesposobnosti potomstva krolika v usloviah ghetero rassialnoi transplantaţii oplodotvorenih iaiţekletok*, Usp. sovrem. biol., 1951, t. XXXI, nr. 2, p. 5.
16. Lîsenko T. D., *Agrobiologia*, Bucureşti, Ed. de stat, 1952.
17. Lopaşov G. V. i Stroeva C. G., *Razvitie immunologhiceskih reakţii i problema nesovmestimosti tkani pri peresadkah*, Usp. sovrem. biol., 1950, t. 30, nr. 2, p. 234.
18. Mastaler G. A., *Vliianie iaicinogo belka na razvitie ptiţ*, D.A.N. SSSR, 1950, t. LXXI, nr. 3.
19. Medawar P. B., *Immunity to Homologous Crafted Skin. II. The Relationship between the Antigens of Blood-and Skin*, Brit. J. Exp. Pathol., 1946, t. 27, p. 15.
20. Menkes B., *Aplicarea metodei mentorului în dezvoltarea embrionară la animale. I. Transplantări de tegument embrionar aparţinînd la rase diferite de găină*, Anal. Acad. R.P.R., Seria ştiinţe medicale, 1950, t. II, mem. 36, p. 1400.
21. — *Observaţii asupra condiţiilor de creştere şi diferenţiere homeo- sau heterotipică*, Studii şi cercetări morfologice, 1956, p. 215.
22. Menkes B., Cotăescu E., Deleanu M. şi Oţetea G., *Cercetări asupra creşterii unor tumori maligne transplantate pe corpul sau pe membrana corion-alantoidiană a embrionului de găină şi asupra reacţiei epiteliilor şi mezenchimului embrionar în prezenţa acestor transplante.* Bul. ştiinţ. Acad. R.P.R., Secţia de ştiinţe medicale, 1956, t. VIII, nr. 1, p. 307.
23. Menkes B. şi Deleanu M., *Cercetări asupra formării şi dezvoltării ţesuturilor hibride la embrioni în diferite condiţii experimentale*, în *Lucrările Sesiunii ştiinţifice a Secţiei de ştiinţe medicale a Academiei R.P.R. din 22—24 ianuarie 1954*, Ed. Acad. R.P.R., 1955, p. 153.
24. Menkes B., Deleanu M., Litvac B. şi Oţetea G., *Asupra vascularizaţiei tegumentului embrionar de găină*, 1956, Studii şi cercetări, Inst. med. Timişoara, p. 15.
25. Menkes B. şi Brătianu-Rîmniceanu C., *Cercetări experimentale asupra rahimieloschisisului*, Bul. ştiinţ. Acad. R.P.R., Seria: ştiinţe medicale, 1950, t. II, nr. 9, p. 1093.
26. Miciurin I. V., *Opere alese*, Ed. Acad. R.P.R., 1954.
27. Mîrza V. şi Menkes B., *Evoluţia funcţională a sistemului nervos. Dezvoltarea penelor şi a pigmentului, analizate prin heterogrefe embrionare interspecifice*, Bul. ştiinţ. Acad. R.P.R., Secţiunea de ştiinţe medicale, 1951, t. III, nr. 2, p. 313.
28. Pavlov I. P., *Opere alese*, ed. a 2-a, Ed. Acad. R.P.R., 1952.
29. Portman A., *Die Ontogenese der Vogel als Evolutionsproblem*, Acta Bioteoretica, 1935, Basel, t. 1.
30. Rowles M. E., *Behaviour of Melanoblasts derived from the Coelomic Lining in Interbreed Grafts of Wing Skin* Physiol. Zool., 1945, t. 18, p. 1—16.
31. Schoene, *Die hetero- und die homoplastische transplantation*, Berlin, Springer, 1912.
32. Sopikov P. M., *Peredacia nadsledstvenih svoitv cerez perelivaemuiu Krovi*, J. agrobiol., 1951, nr. 6, p. 121.
33. Tokin B. P., *Immunitet zarodişei*, Izd. Leningr. Univ., 1955.
34. Weiss P. a. Wang H., *Growth Response of the Liver of Embryonic Chick Hosts to the Incorporation in the Area Vasculosa of Liver and other Organ fragments*, Anat. Record, 1941, t. 79.

35. Willier B. H., *Hormonal Regulation of Feather Pigmentation in the Fowl*, The Biol. of Melanomes, New York ed. Acad. of Sciences, Sect. of Byol., 1948, p. 321.
36. Willier B. H. a. Rowles M. E., *The Control of Feather Color Pattern by Melanophores Grafted from one embryo to another of a Different Breed of Fowl*, Physiol. Zool., 1940, t. 13, p. 177.
37. Winkler-Bauer, *Die Chimaerenforschung als Methode der experimentellen Biologie*, Sitz. Phys. Med. Ges Wurzburg, 1913, 1950, p. 119.
38. Wolff M. et Ostertag G., *Sur l'évolution des canaux Müller chez l'embryon de poulet explantés en greffes chorio-allantoïdiennes*, C. R. Soc. biol., 1949, nr. 143, p. 692.

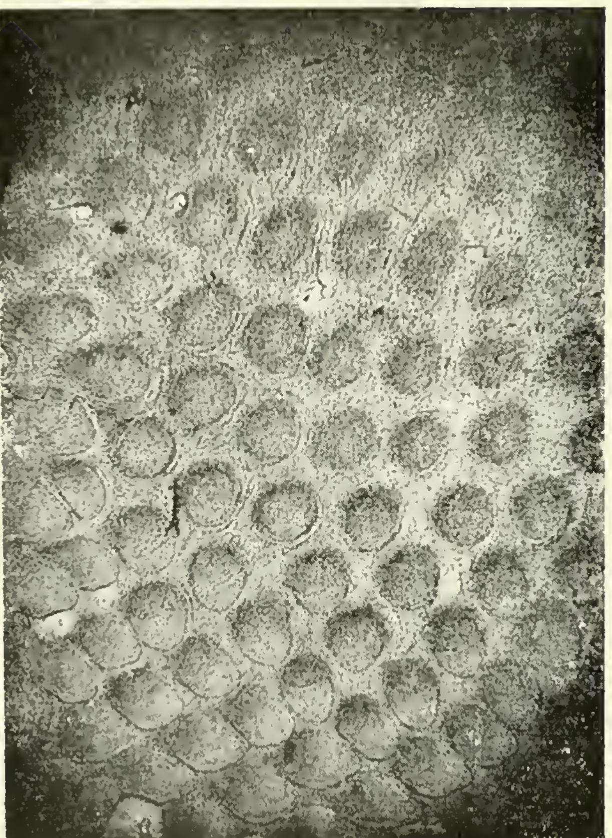


Fig. 278. — Tegumentul embrionului de găină Leghorn de 8 zile de incubație (regiunea dorsală). Formarea papilelor dermice.



Fig. 279. — Tegumentul embrionului de găină de 9 zile de incubație. Secțiune prin primordiul pufului embrionar. Componenta epitelială, componenta conjunctivă vasculară.

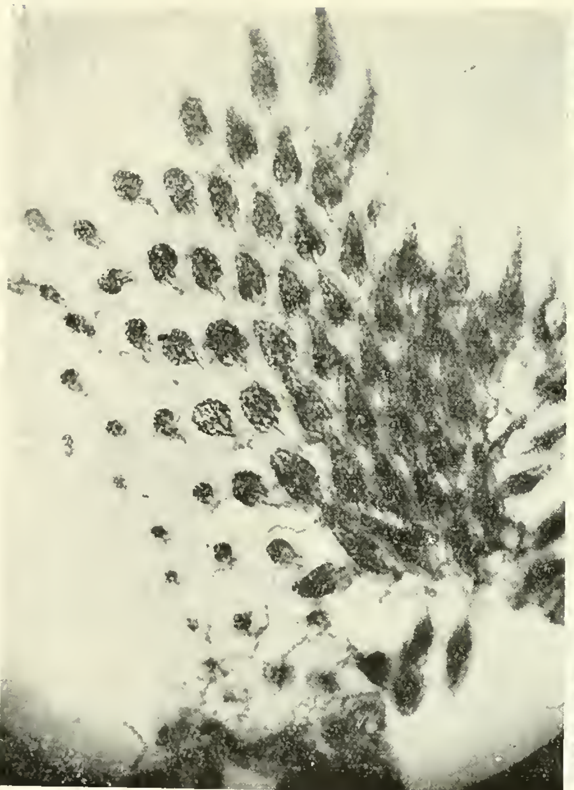


Fig. 280. — Tegumentul dorsal al embrionului de găină Leghorn de 12 zile de incubaţie. Injectarea capilarelor cu tuş.



Fig. 281. — Membrul superior al embrionului de găină de 12 zile de incubaţie. Injectarea capilarelor cu tuş.



Fig. 282. — Tegumentul dorsal al embrionului de găină de 13 zile de incubaţie. Injectarea capilarelor cu tuş.

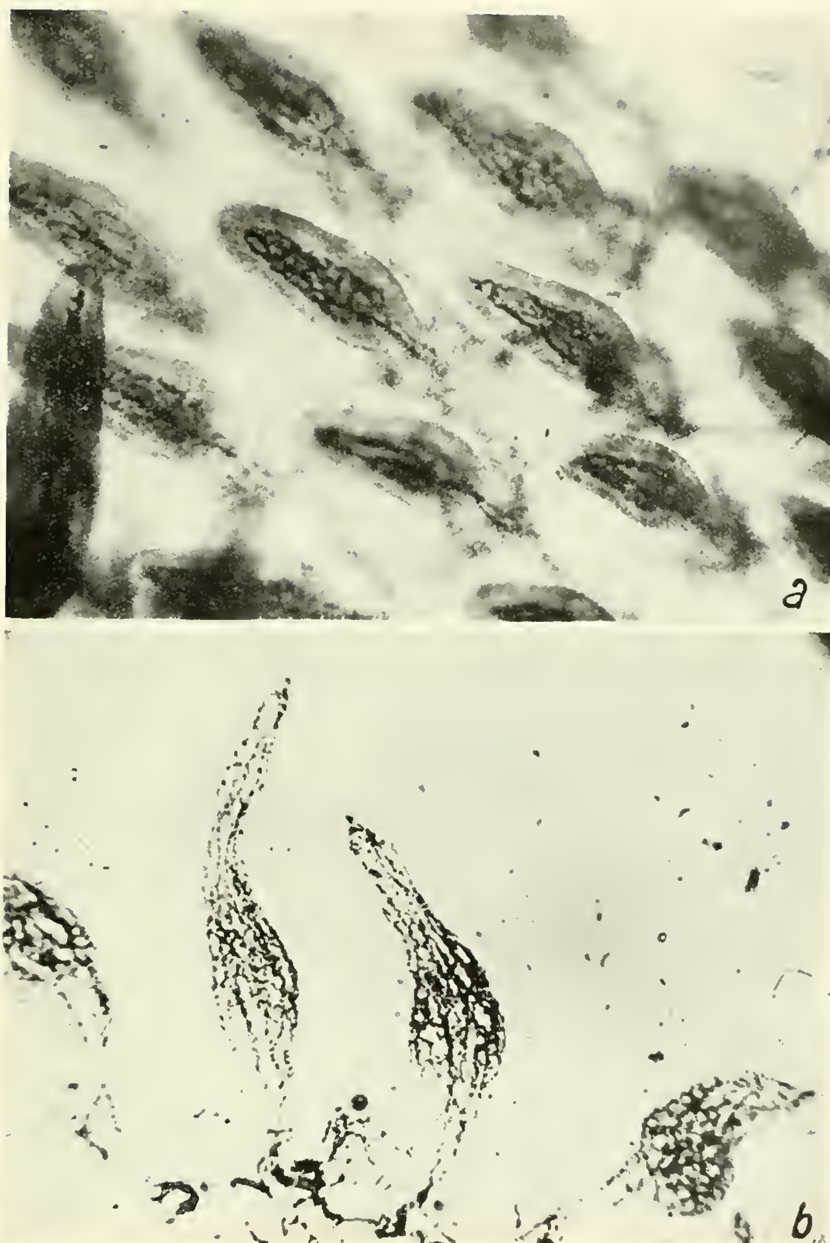


Fig. 283. — *a* — Tegumentul embrionului de găină de 12 zile de incubaţie. Injectarea capilarelor cu tuş. *b* — Acelaşi tegument, altă regiune.

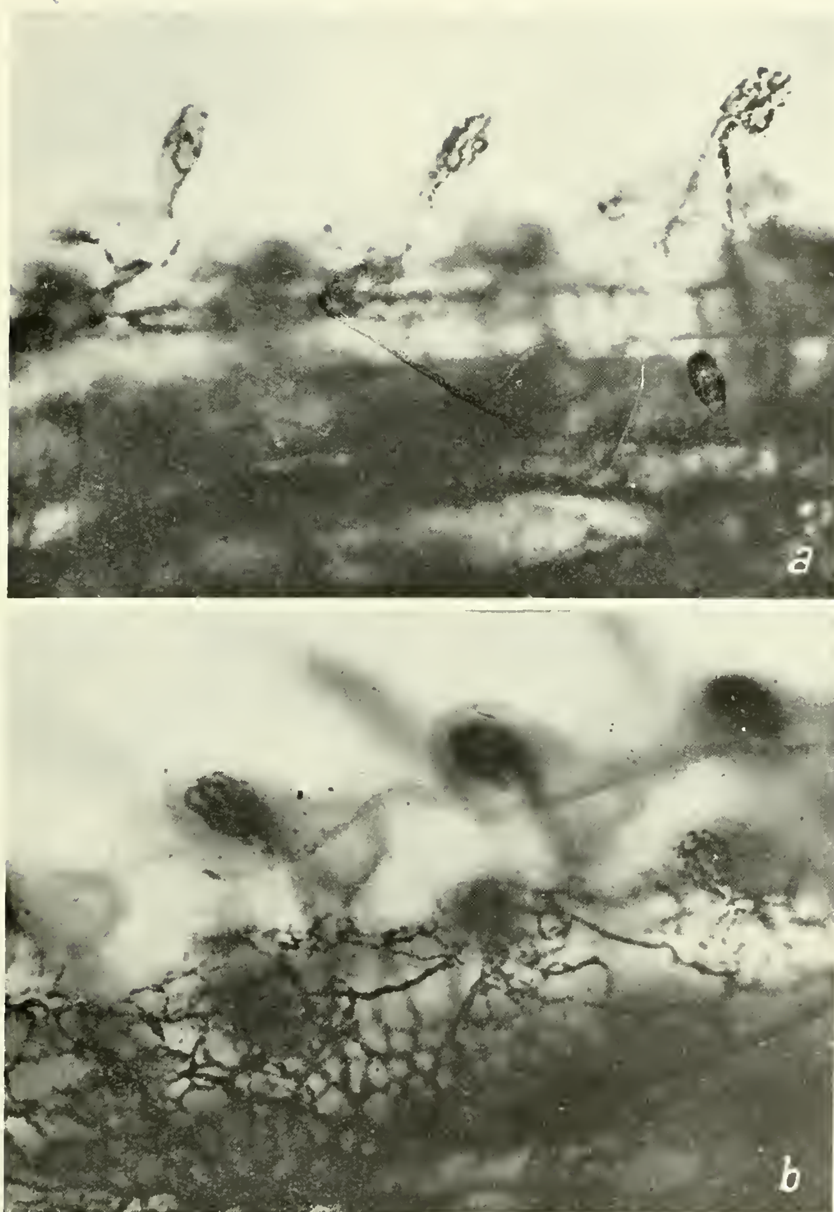


Fig. 284. — *a* — Tegumentul embrionului de găină de 12 zile de incubație. Membrul superior. Injectarea totală a vaselor cu tuș. *b* — Alte amănunte din același preparat.

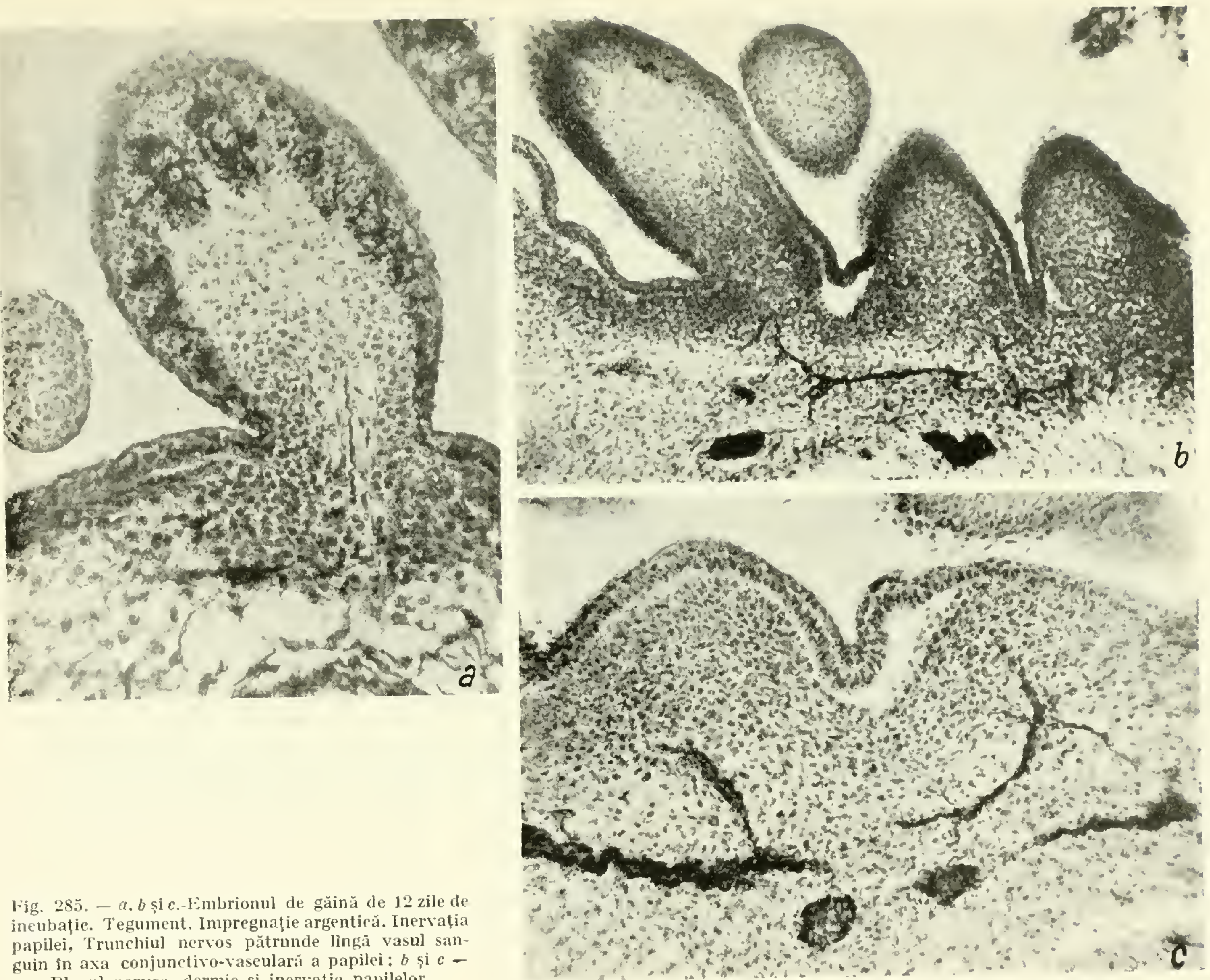


Fig. 285. — *a*, *b* și *c*.-Embrionul de găină de 12 zile de incubație. Tegument. Impregnație argentică. Inervația papilei, Trunchiul nervos pătrunde lîngă vasul sanguin în axa conjunctivo-vasculară a papilei ; *b* și *c* — Plexul nervos dermic și inervația papilelor.

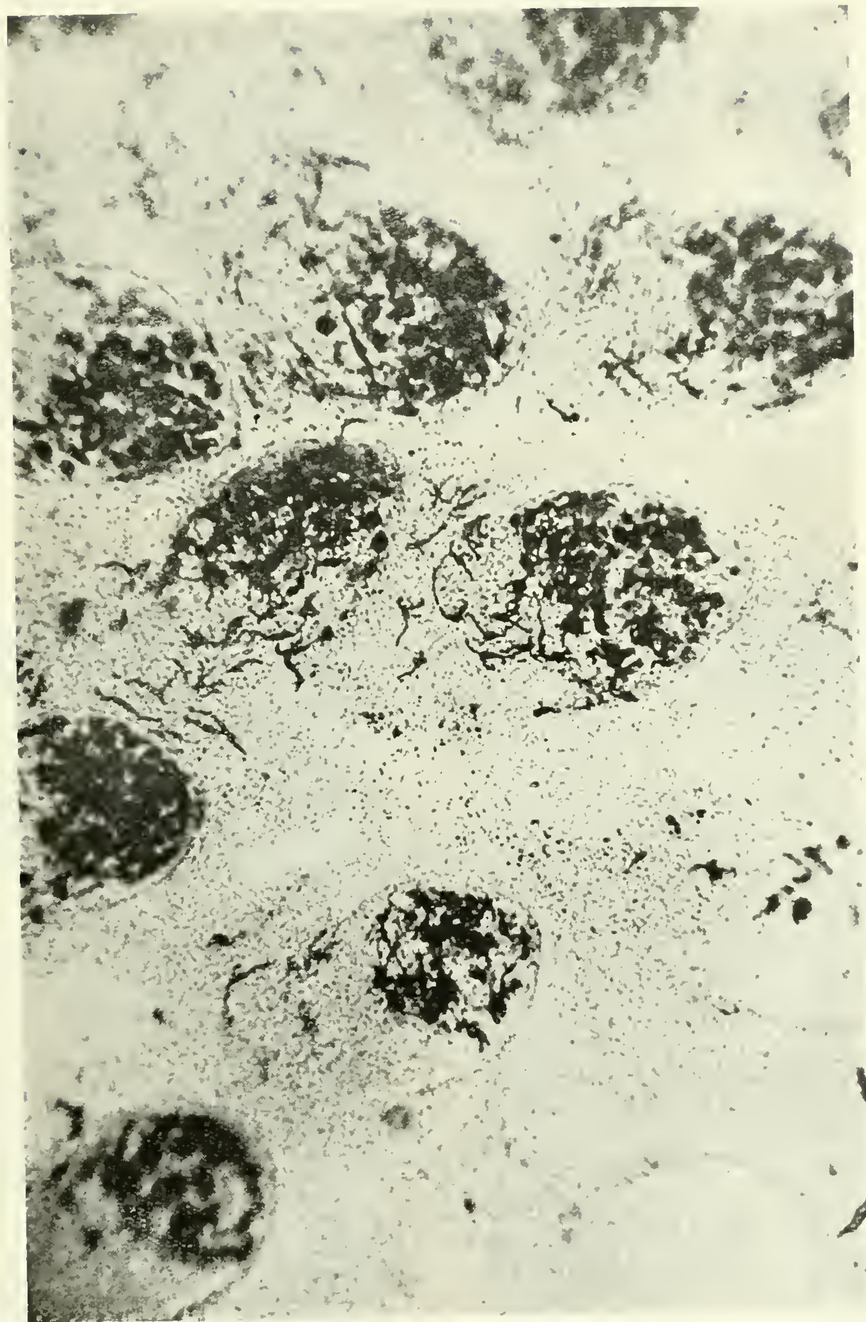


Fig. 286. — Tegumentul embrionului Plymouth de 9 zile de incubație. Intensă multiplicare a melanoblaștilor înăuntrul papilelor pufului.

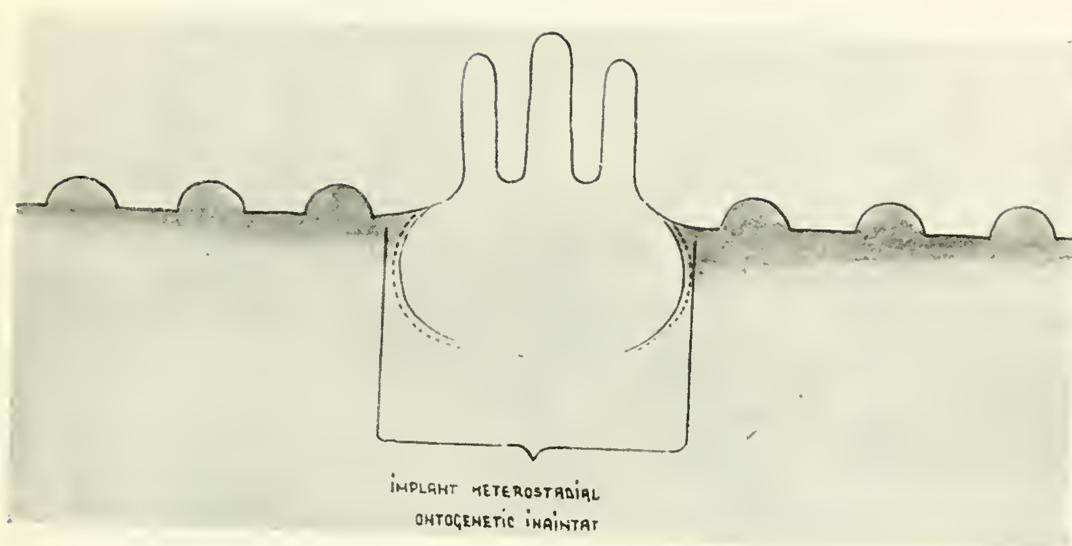


Fig. 287. — Schema implantului de tegument heterostadial, ontogenetic înaintat. Papilele gazdei, mai puțin avansate, nu sînt stimulate de un asemenea implant.



Fig. 288. — Embrion Leghorn de 6 zile de incubație. Implant de tegument Plymouth cu avans ontogenetic de 5 zile.



Fig. 289. — Embrion Leghorn de 7 zile de incubație, cu implant Plymouth.



Fig. 290. — Embrion Leghorn de 8 zile de incubație. Implant Plymouth, cu avans ontogenetic de 5 zile. Difuziunea melanoblaștilor în gazdă.

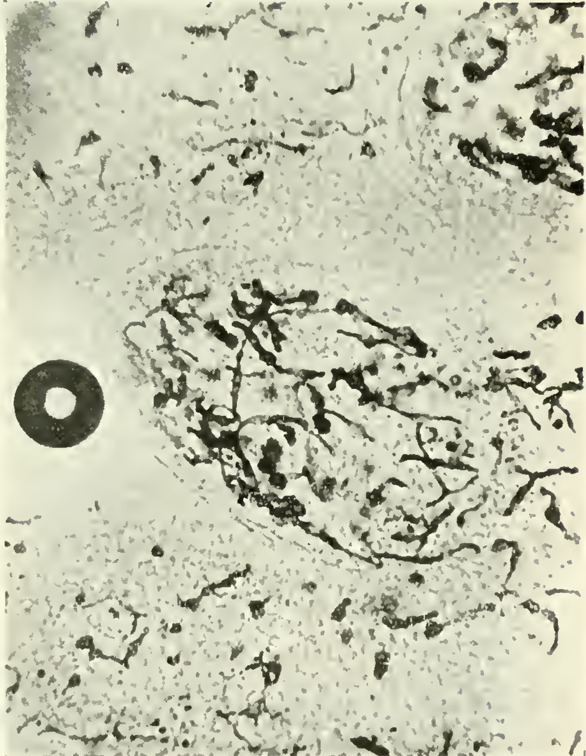


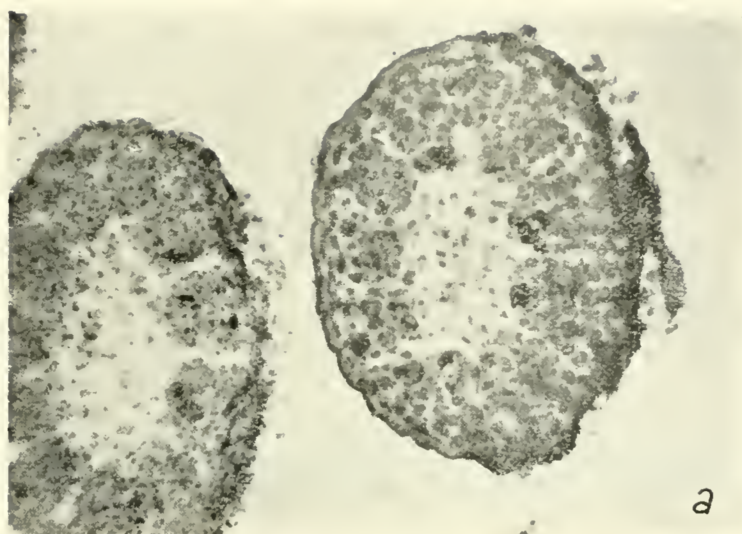
Fig. 291. — Tegumentul hibrid al embrionului din figura 290.



Fig. 292. — Embrion Leghorn de 11 zile incubaţie, cu implant Plymouth. Zona de difuziune a melanoblaştilor în gazdă.



Fig. 293. — Embrionul Plymouth de 8 zile de incubaţie. Implant de tegument Leghorn, cu avans ontogenetic de 5 zile, care s-a înnegrit prin intensa înmulţire a melanoblaştilor gazdei.





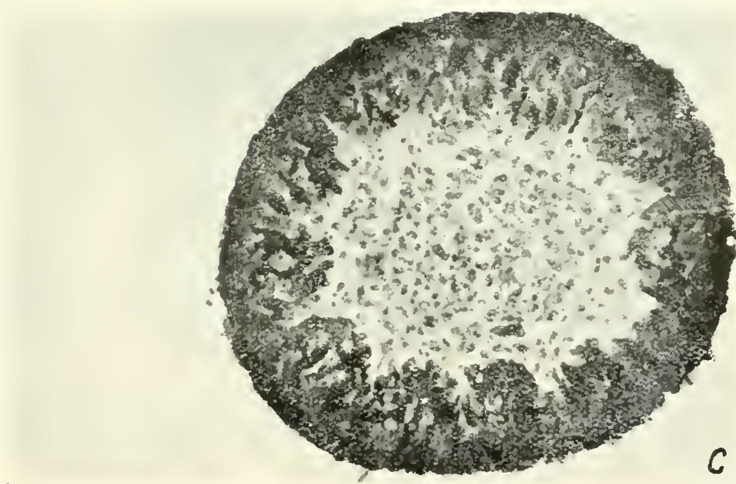


Fig. 294. — *a* şi *b* — Secţiuni transversale prin papila Leghorn. Promelanoblaştii sînt evidenţiaţi prin impregnaţie argentică. Ei se află dispuşi tipic la baza crestelor epiteliale. *c* — Secţiune transversală printr-o papilă Plymouth. Aşezare normală a melanoblaştilor.

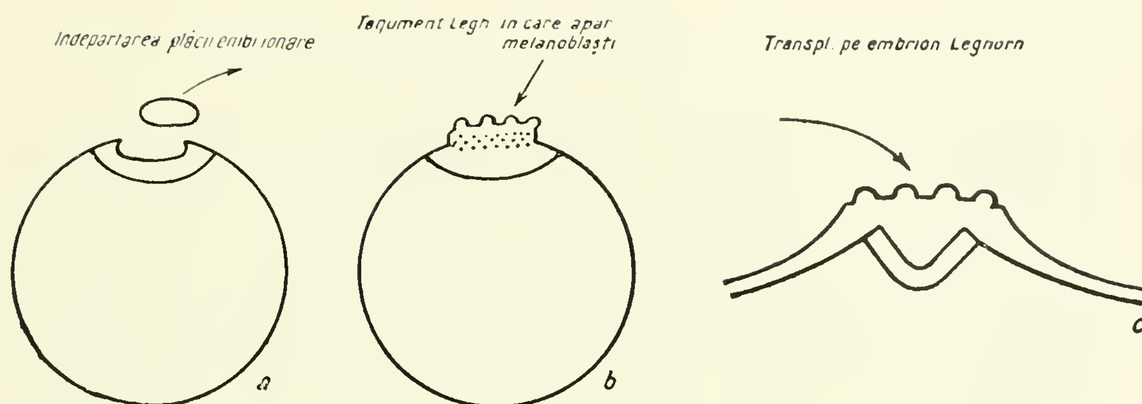


Fig. 295. — Schema culturii „în ou" a tegumentului embrionar. *a* — Îndepărtarea plăcii embrionare. *b* — Depunerea tegumentului embrionar în locul plăcii embrionare. *c* — Retransplantarea tegumentului cultivat în ou, pe embrionul de găină.



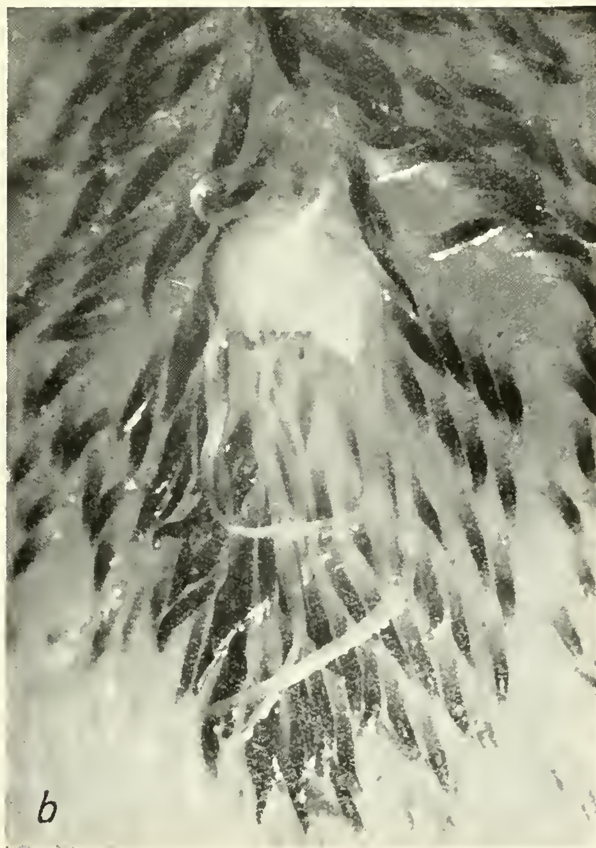


Fig. 296. — *a* — Implant de tegument de porumbel (rasă pigmentată) în gazda Leghorn. Implatul se dezvoltă nepigmentat ; „explozie de pigment" în tegumentul gazdei ; melanizarea promelanoblaștilor difuzați. *b* — Detalii din *a*.

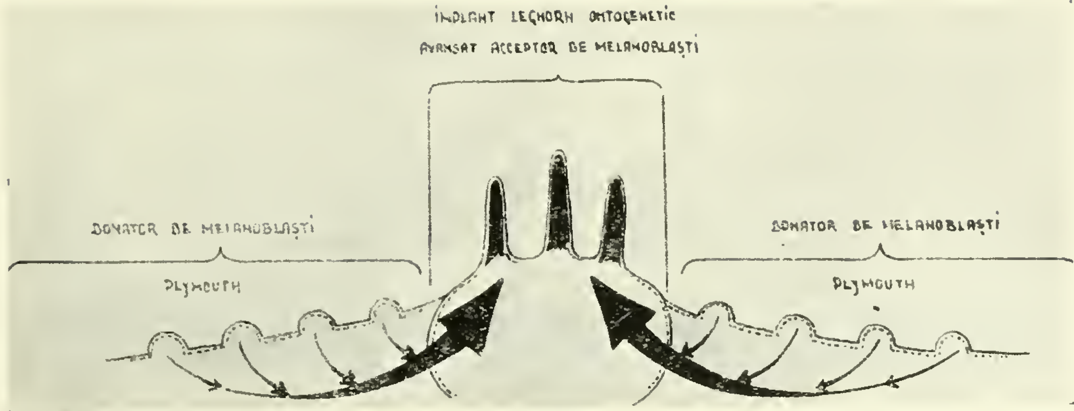


Fig. 297. — Schema implantului acceptor de melanoblaşti. Acceptor: tegument Leghorn, Donator: tegument Plymouth.

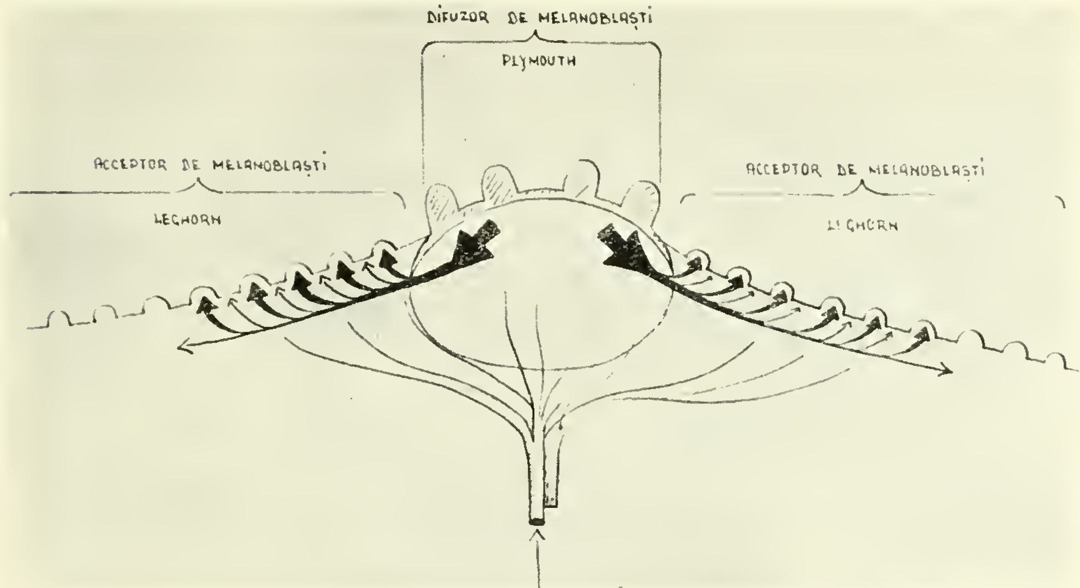


Fig. 298. — Schema implantului difuzor de melanoblaşti. Acceptor: Leghorn. Difuzor: tegument Plymouth.

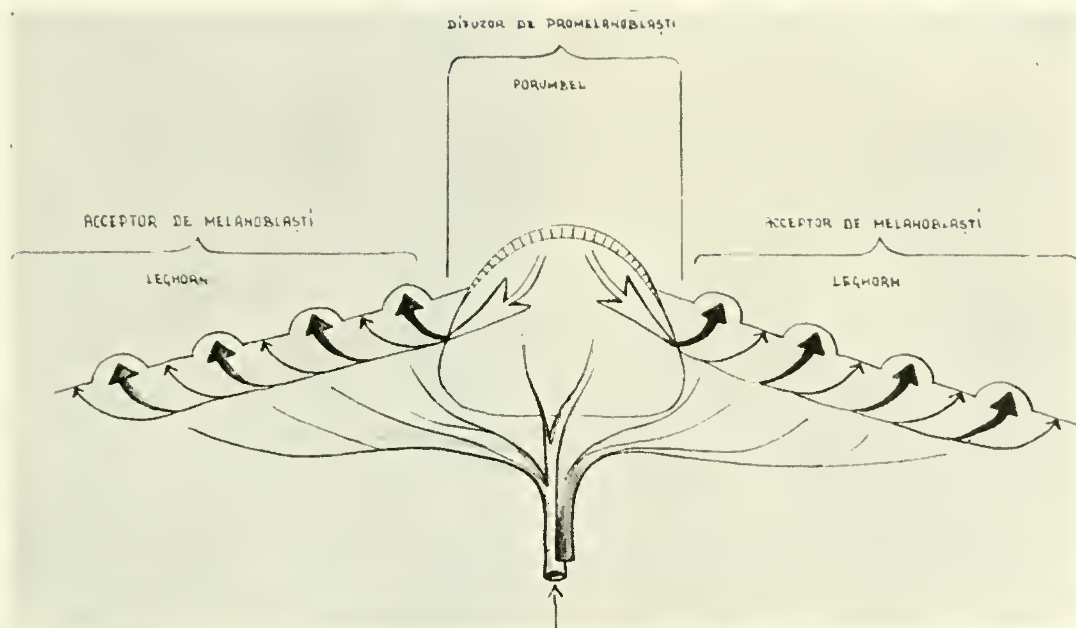


Fig. 299. — Schema implantului difuzor de promelanoblaști. Difu zor : tegument de porumbel. Acceptor : tegumentul Leghorn.

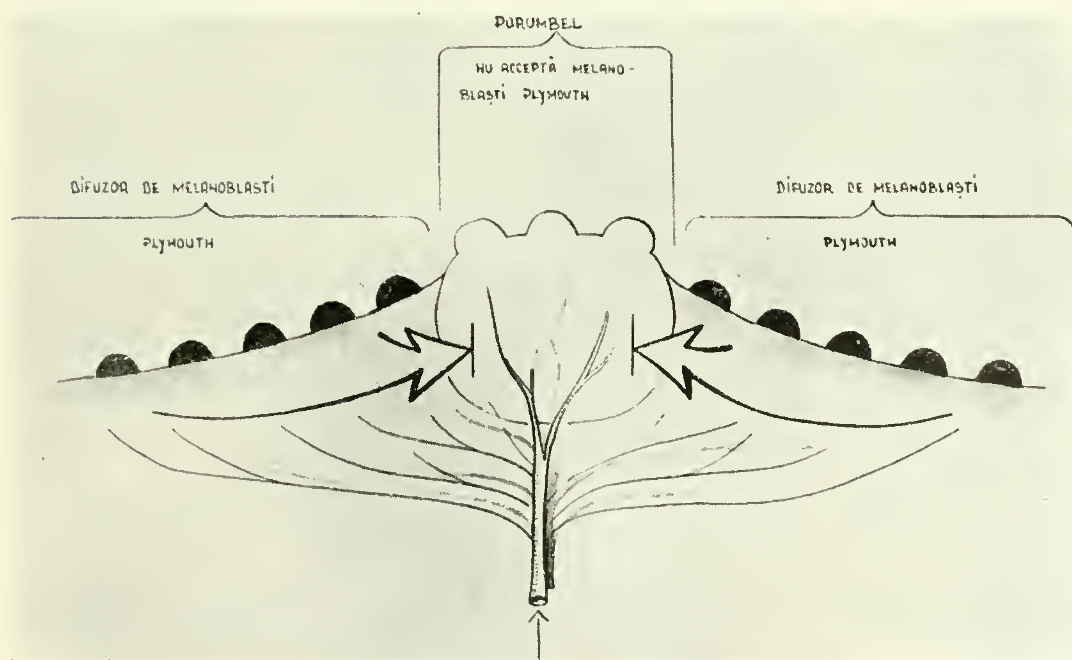


Fig. 300. — Schema implantului neacceptor de melanoblaști. Sursa : tegument Plymouth. Neacceptor : tegument porumbel.



Fig. 301. — Transplant de tegument Plymouth pe porumbel. Absența difuziunii melanoblaștilor în gazdă.

Fig. 302. — *a* și *b* — Amănunte din figura 301.

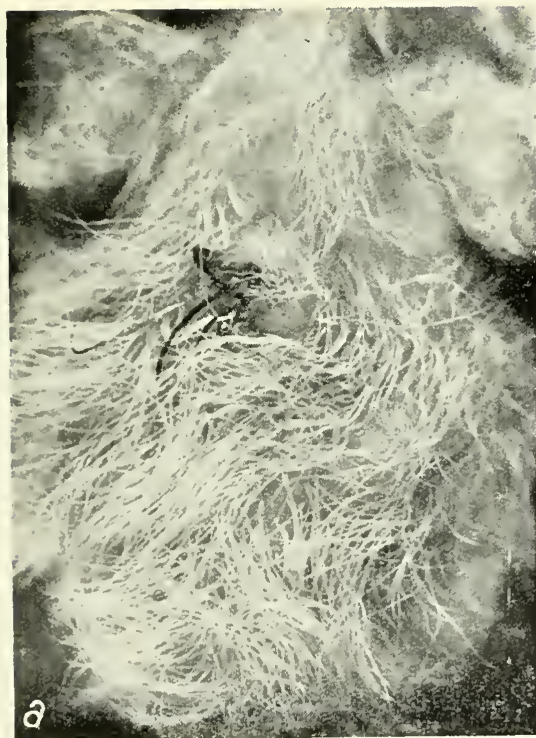






Fig. 303. — **Implant de tegument de papagal (*Melopsitacus ondulatus*)** în gazda Leghorn.

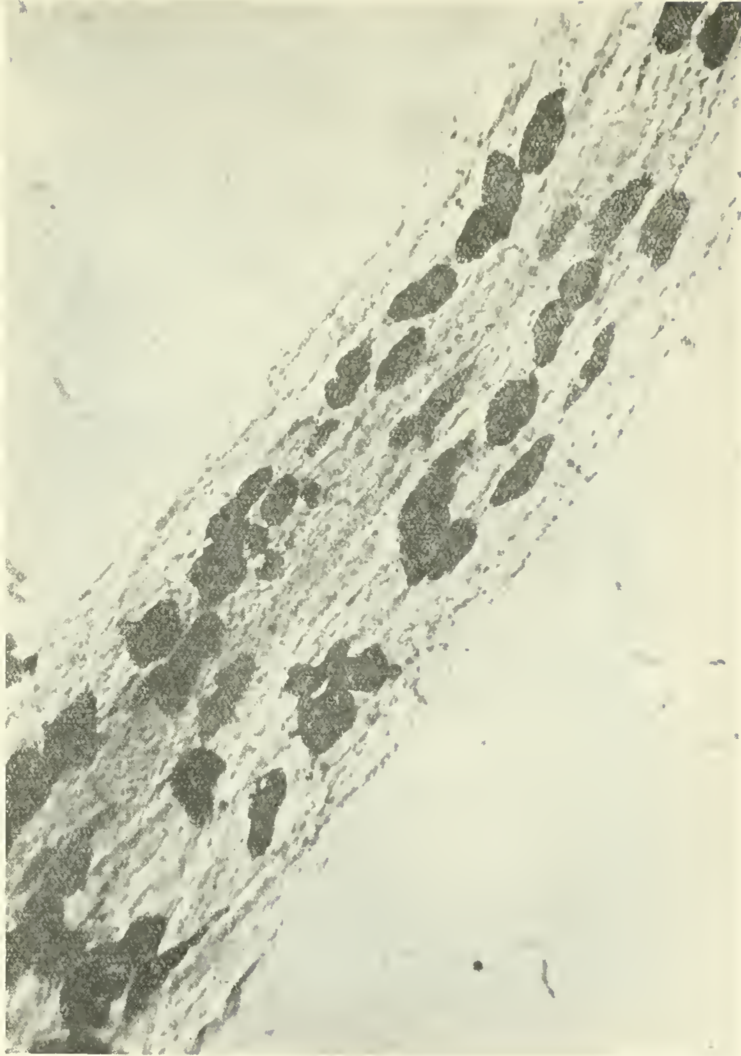


Fig. 304. — **Aspectul melanoblaştilor de papagal imigraţi în puful** embrionului Leghorn.

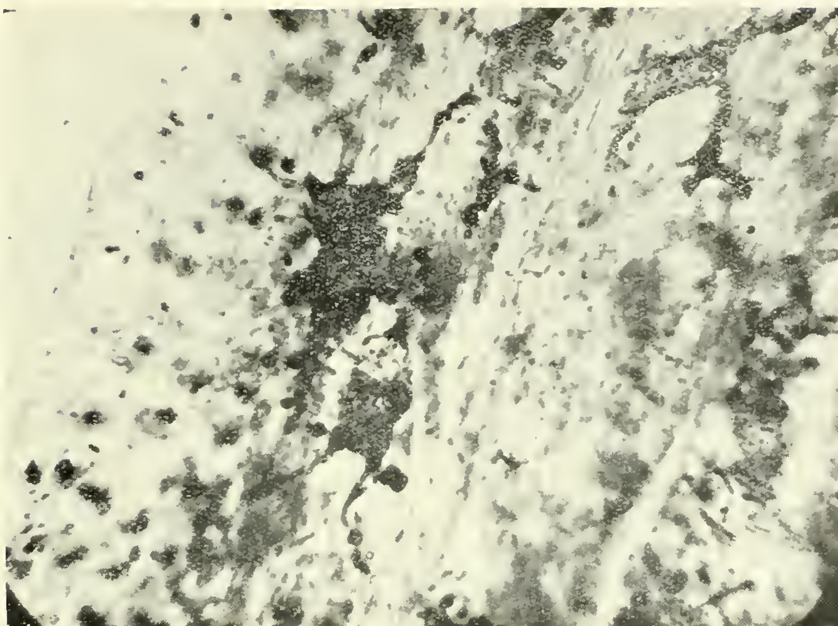


Fig. 305. — Aspectul melanoblaștilo Plymouth imigrați în puful embrionului Leghorn.

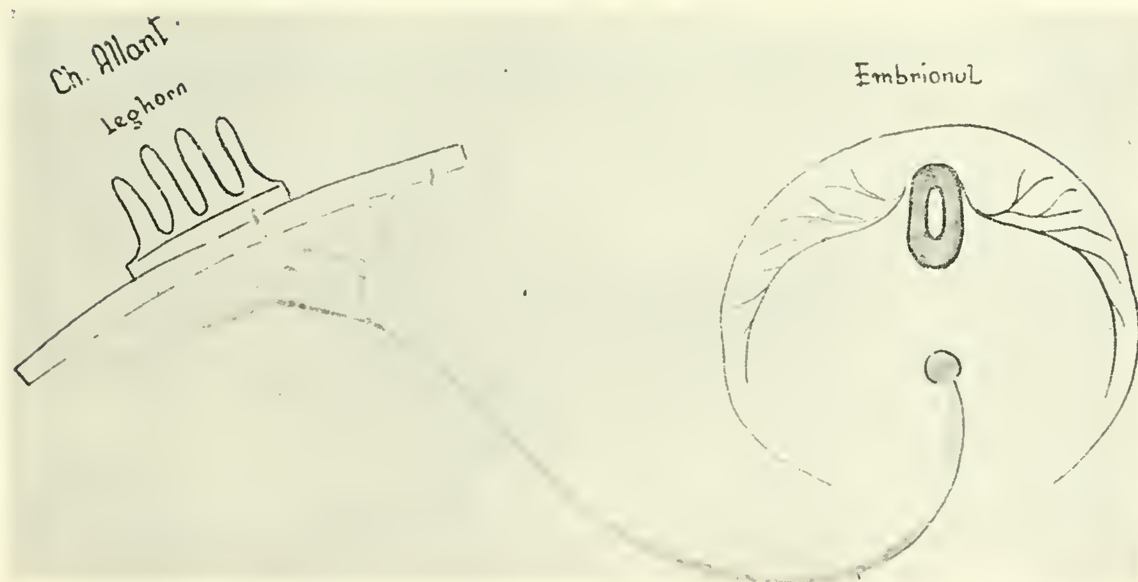


Fig. 306. — Schema culturii tegumentului embrionar pe membrana corion-alantoidiană, neinervată, însă irigată de către embrion.

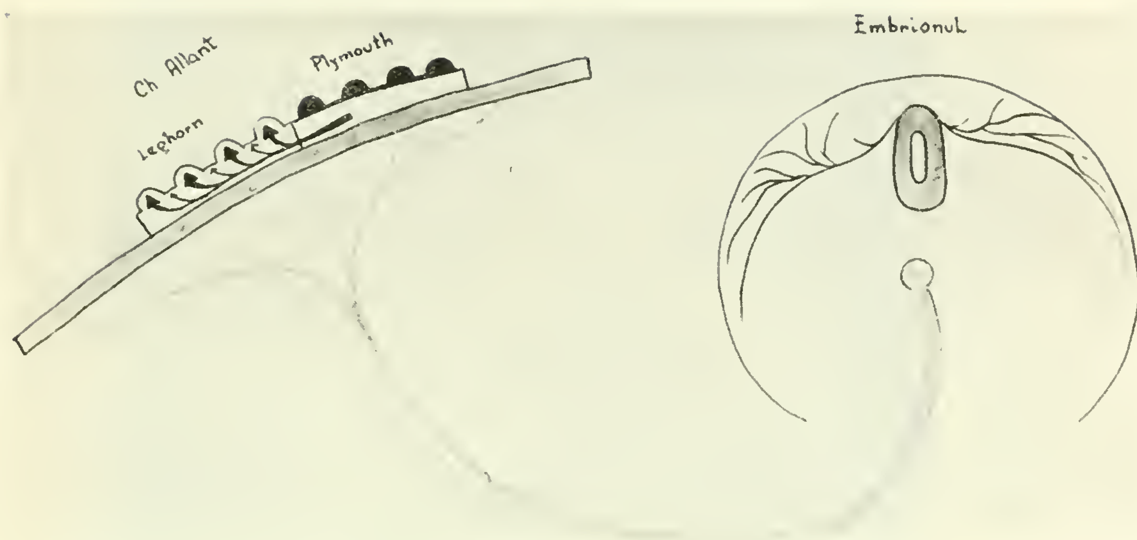


Fig. 307. — Schema culturii afrontate : Leghorn — Plymouth pe corion-alantoida embrionului Leghorn. Difuziunea melanoblaştilor din tegumentul Plymouth în tegumentul Leghorn.

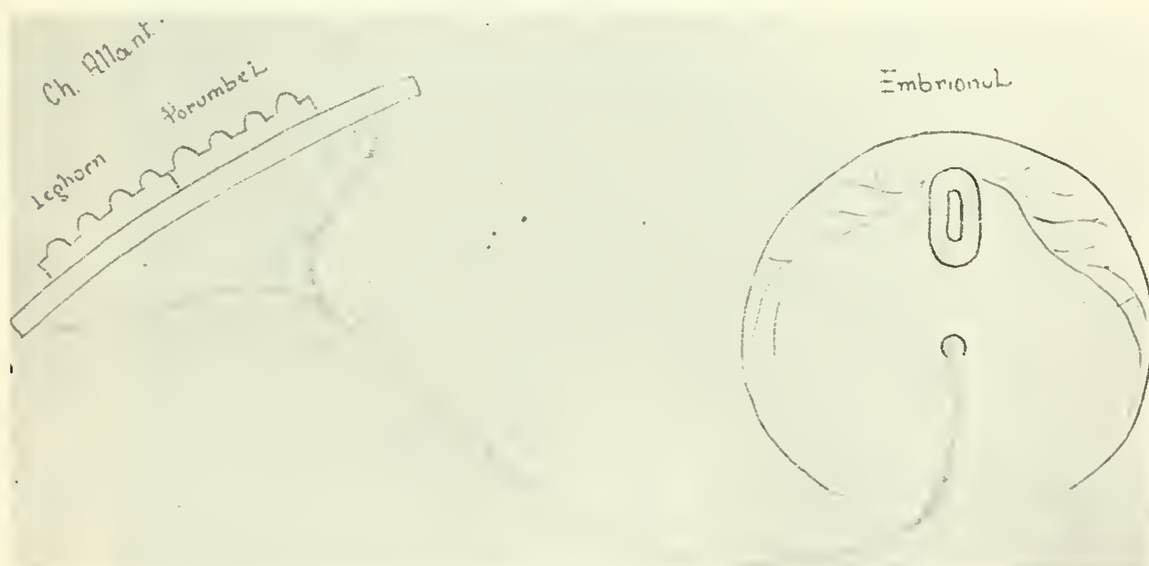


Fig. 308. — Schema culturii afrontate : Leghorn — porumbel, pe corion-alantoida embrionului Leghorn. Absenţa melanizării promelanoblaştilor de porumbel în aceste condiţii.

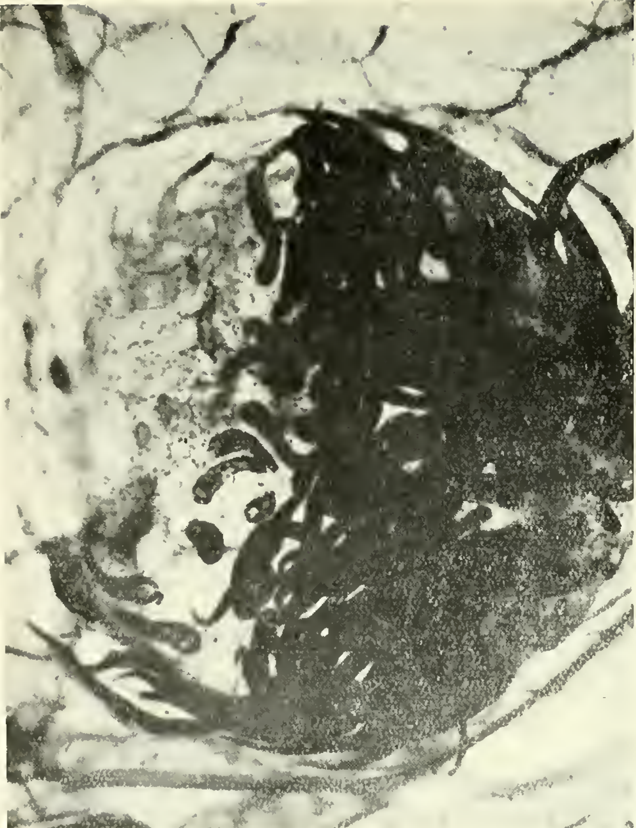


Fig. 309. — **Cultura afrontată : Leghorn — Plymonth pe membrana corion-alantoidiană a embrionului Leghorn. Difuziune de melanoblaști.**



Fig. 310. — **Cultura afrontată : Leghorn — porumbel, pe membrana corion-alantoidiană a embrionului Leghorn. Absența melanizării promelanoblaștilor de porumbel în aceste condiții.**

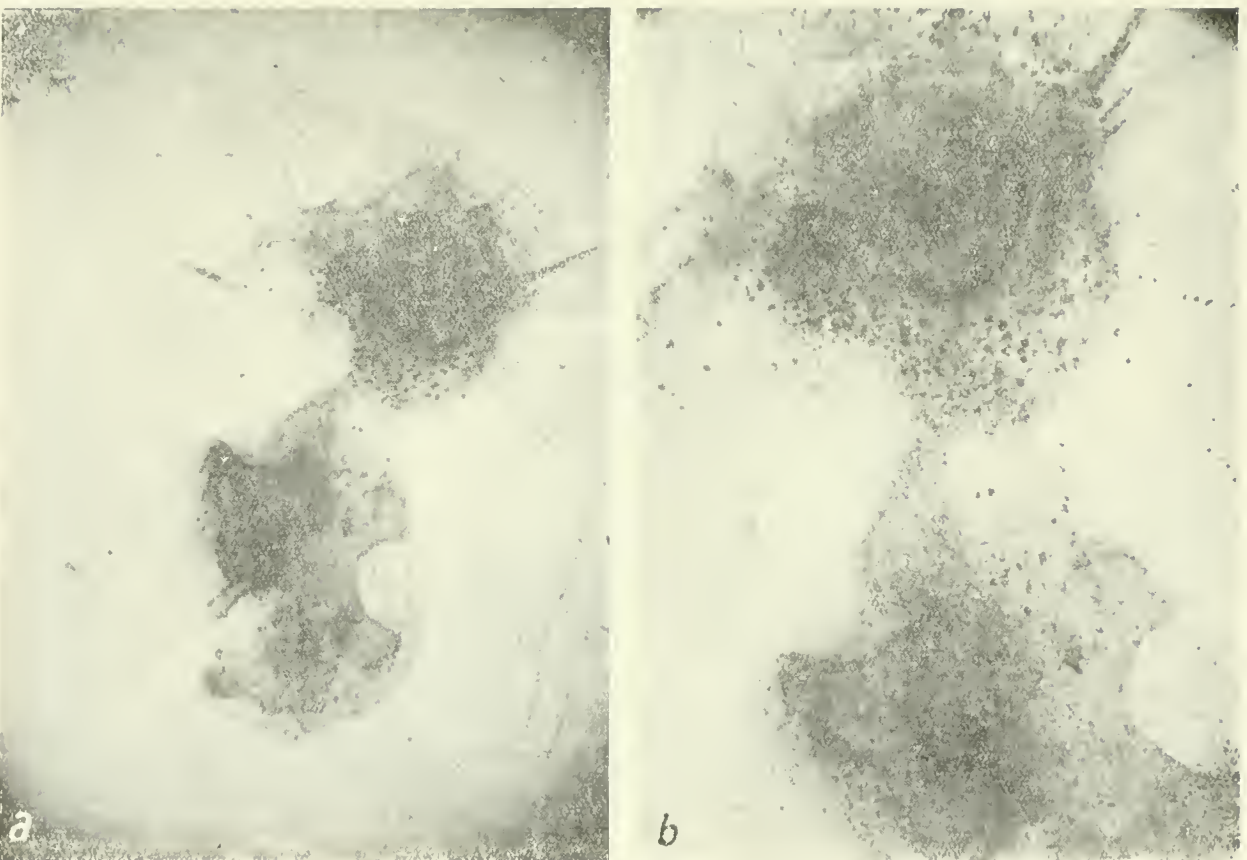


Fig. 311. — *a* și *b* — Cultură de țesut (plasmă heparinată) de tegument embrionar de porumbel și Leghorn. Formarea unei punți de legătură. Absența apariției melanoblaștilor de porumbel.

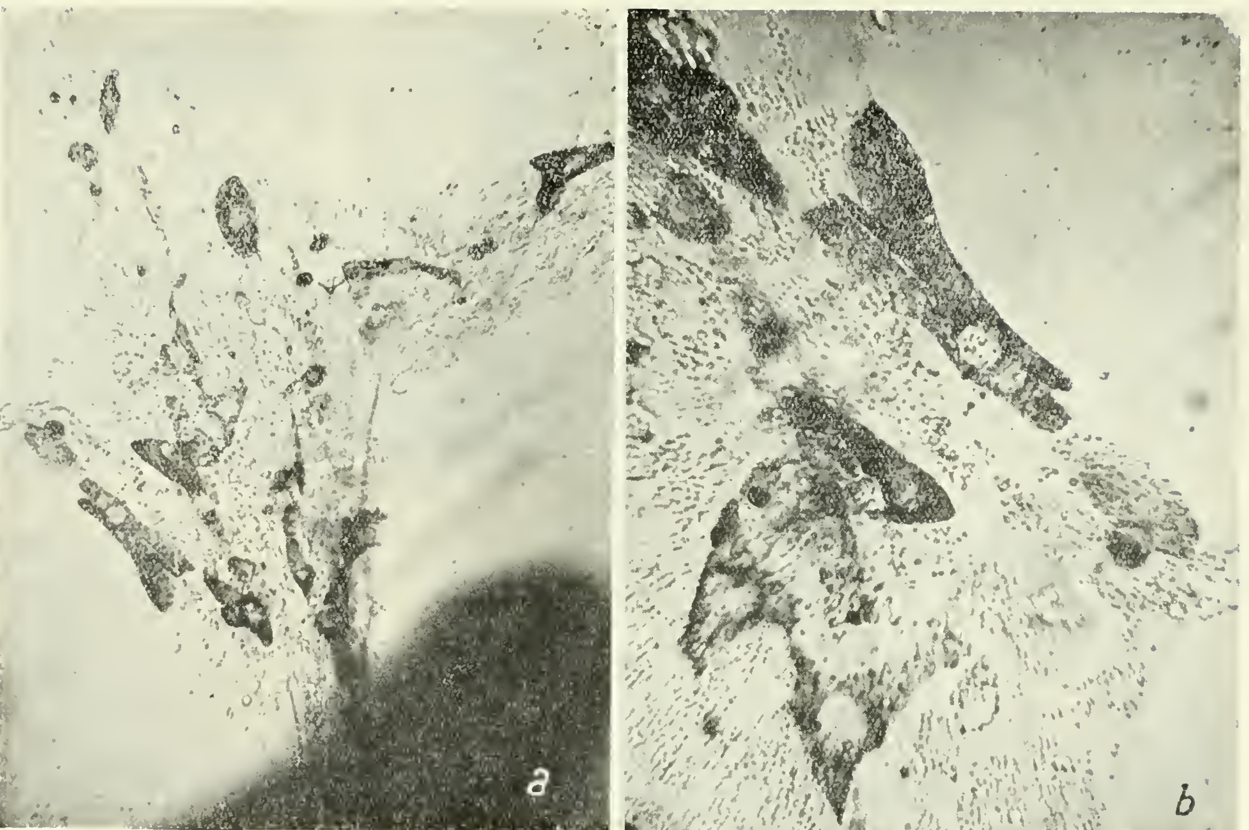


Fig. 312. — *a* și *b* — Cultura de țesut a tegumentului embrionar Plymouth. Migrarea și înmulțirea melanoblaștilor în zona de creștere.





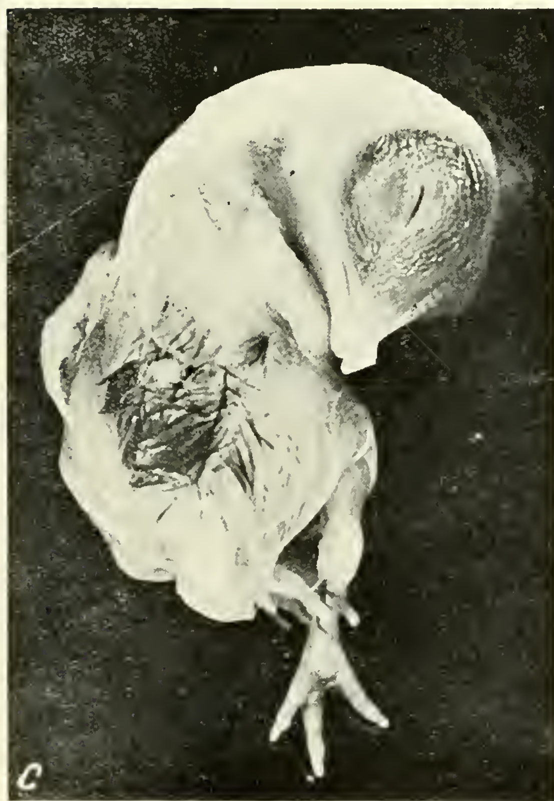


Fig. 313. — Embrionii de găină de rasa Leghorn *a* şi *c*, cărora li s-au implantat, în a treia zi de incubaţie, grefe de tegument embrionar de porumbel, rasa pigmentată, de 6 zile. În centru (*b*), un embrion de porumbel, rasa pigmentată, în a 15-a zi de incubaţie, al cărui frate a fost utilizat ca donator de tegument pentru aceste grefe. În tegumentul gazdei se constată în jurul grefonului o zonă intens pigmentată prin emigrarea promelanoblaştilor din papilele implantului, care rămîn nepigmentate sau foarte slab pigmentate. Tegumentul embrionului porumbel, folosit ca martor, arată creşterea şi diferenţierea papilelor penelor şi lipsa de pigment în timpul dezvoltării embrionare (pigmentul apare, în mod normal, abia la cîteva săptămîni după ecloziune).

PARTEA A IV-a

CERCETĂRI ASUPRA FUNCȚIILOR UNOR ORGANE EMBRIONARE

67 — c. 1778

CONŢINUTUL

Consideraţii generale asupra funcţiilor organelor embrionare. Critica concepţiei lui W. Roux, asupra aşa-ziselor perioade prefuncţionale. Despre funcţiile „preadulte". Două categorii de organe embrionare : organe embrionare unice şi cupluri de organe homeofuncţionale. Studiul cuplurilor homeofuncţionale ca metodă de analiză a dezvoltării şi diferenţierii funcţiilor organelor embrionare. Cuplul homeofuncţional : mezonefros-metanefros. Probe funcţionale la rinichiul embrionar : fixarea albastrului de tripan, eliminarea roşului neutru, eliminarea cristalelor de acid uric, concentraţia şi eliminarea indigocarminului, evidenţierea fosfatazelor alcaline, depunerile de glicogen, studiul condriomului renal şi fluorescenţa nefronilor în lumina ultravioletă filtrată. Observaţii asupra funcţiilor ficatului şi pancreasului embrionar. Observaţii asupra unor particularităţi funcţionale ale mucoasei gastrice la embrionul de găină. Despre fenomenele de secreţie ale epiteliilor bronhiilor embrionare.

CONSIDERAŢII GENERALE ASUPRA FUNCŢIUNILOR ORGANELOR EMBRIONARE

Cercetările tradiționale de embrio-fiziologie extind studiul funcțiilor organelor adulte — pe deplin diferențiate — asupra perioadei prenatale sau preeclozionale, urmărind manifestările acestor funcții în faze ontogenetice din ce în ce mai precoce, pînă la primele lor începuturi. În felul acesta, una din problemele embrio-fiziologiei constă în stabilirea momentului „apariției", la organul embrionar, a funcției specifice, mai mult sau mai puțin asemănătoare cu aceea a organului adult. O altă latură a acestor cercetări constă în stabilirea raportului diferențierii morfologice cu instalarea acestei funcții specifice.

Toate aceste cercetări pornesc deci de fapt — din punctul de vedere expus — de la organul adult și urmăresc — oarecum în sens retrograd — funcția bine cunoscută a substratului diferențiat adult, în stadiile din ce în ce mai tinere ale embrionului, oprindu-se la primele semne ale manifestării ei.

W. Roux este creatorul cunoscutei scheme generale a fazelor prin care ar trece orice organ în decursul ontogenezei. Organul ar străbate — după Roux — o primă perioadă afuncțională sau prefuncțională, în timpul căreia dezvoltarea lui s-ar face exclusiv pe baza eredității, intrînd apoi în perioada sa funcțională, cînd organul este modelat de stimulii funcționali, deci de însuși procesul său funcțional. După Roux, în această perioadă, dezvoltarea și chiar menținerea organului depind — în primul rînd — de exercitarea funcției sale specifice (perioada apariției structurii funcționale).

Primordiul fiecărui organ embrionar ar străbate deci, conform acestor concepții, o primă perioadă „prefuncțională", cu procese morfogenetice fundamentale (apariția primordiilor de organe) pînă ce, la un moment dat, și-ar face apariția diferențierea morfologică (histologică), coincizînd mai mult sau mai puțin cu începutul fazei „funcționale".

Această concepție s-a împletit cu încercări de a stabili caracterul „autodeterminat" sau „dependent" al diferențierii primordiilor de organe. După ce s-a alcătuit o listă de cîteva specii cu organe considerate ca aparținînd categoriei primordiilor cu autodeterminare (cu dezvoltare independentă) în opoziție cu alte specii, ale căror organe s-ar dezvolta numai sub imperiul unei influențe venind din partea celorlalte organe embrionare (dezvoltare dependentă), s-a văzut că de fapt o dezvoltare „independentă" (în sensul propriu) nu există, ci numai perioade de determinare, situate în momente mai precoce sau mai tîrzii ale procesului de dezvoltare ontogenetică.

Concepția lui W. Roux despre perioade „prefuncționale" se caracterizează de fapt printr-o despărțire a formei de funcție într-o anumită epocă a ontogenezei, admițînd pentru o perioadă dezvoltarea unor forme și structuri considerate afuncționale și separînd astfel factorii dezvoltării de funcțiile primordiilor și organelor embrionului [1].

W. Roux și după aceea K. Peter au dat totuși o deosebită importanță distincției dintre „funcțiile morfogenetice" și „funcțiile de întreținere" (*Gestaltungsfunctionen* și *Erhaltungsfunctionen*). Aceste noțiuni trebuiau să atenueze întrucîtva contrastul creat între o perioadă afuncțională, însă cu morfogeneză intensă și perioada următoare, funcțională, considerînd și dezvoltarea formelor și a structurilor din prima perioadă din punctul de vedere funcțional. Dar autorii citați nu ne spun nimic despre natura funcțiilor morfogenetice în această perioadă și nu înfățișează în suficientă măsură intima legătură și întrepătrundere, legăturile reciproce ale acestor două funcțiuni, ceea ce constituie una din laturile negative ale așa-zisei „mecanici a dezvoltării".

Pe baza concepției materialist-dialectice a dezvoltării ontogenetice, nu se poate admite existența unor faze prefuncționale, în care morfogeneza ar fi total despărțită de funcție.

Căutînd izvorul cauzelor dezvoltării individuale în interacțiunile care se produc în sînul complexului ontogenetic și considerînd efectul acestor forțe ca manifestarea reactivității substanței vii, reactivitate care se schimbă cantitativ și calitativ de-a lungul treptelor ontogenetice, nu putem separa funcțiile primordiilor embrionare de interacțiunile pe care acestea le întrețin între ele.

Cum s-a mai spus, există o continuă dezvoltare a acestor interacțiuni și deci a funcțiilor organelor embrionare „preadulte" de-a lungul diferitelor trepte de dezvoltare, ducînd în cele din urmă și în perioade care diferă de la organ la organ (și de la specie la specie) la ceea ce se cheamă „pragul funcțional adult", adică la apariția funcțiilor specifice organului pe deplin dezvoltat.

Pragul funcțional nu este deci un hotar, care ar despărți o perioadă afuncțională de una funcțională, ci punctul critic al unei schimbări calitative funcționale. Aceste momente critice, legate de transformări ale tipului de metabolism, sînt în multe cazuri —la embrionul de găină de exemplu—în corelație cu fenomene ca dezvoltarea circulației viteline, trecerea la hematoză prin circulație alantoidiană, formarea lichidului subembrionar prin transferul apei din albuș în gălbenuș și altele.

Ontogeneza embrionară cunoaște astfel o serie de perioade de tranziție, perioade în care intervin schimbări ale condițiilor de dezvoltare.

Noi studiem aceste perioade de tranziție nu numai pentru analiza procesului ontogenetic și importanța lor în cercetarea dezvoltării funcțiilor organelor embrionare, ci și pentru a găsi (pe baza concepției lui I. V. Miciurin), mijloace de dirijare a mersului ontogenezei pe căi noi, modificînd condițiile de dezvoltare în timpul acestor perioade. Concepția miciurinistă admite posibilitatea zdruncinării eredității prin asemenea intervenții.

Embrionul este o realizare treptată, în prezența unor condiții necesare, a trecutului istoric acumulat. Strîns împletit cu acesta, embrionul își are actualitatea sa morfo-funcțională. El trăiește și posedă țesuturi și organe care îi asigură, prin funcțiile lor, viața și continuarea proceselor de dezvoltare.

---

[1]) Acest lucru pare cu atît mai straniu, cu cît W. Roux este cunoscut ca unul dintre cei mai aprigi apărători ai ideii legăturii dintre formă și funcție.

O dată cu perioada ontogenetică embrionară începe însă și adaptabilitatea la noi condiții (care pot apărea din mediu) și sub acțiunea cărora dezvoltarea individuală — și prin aceasta dezvoltarea generațiilor viitoare — poate fi schimbată (vezi concepțiile filembriogenetice ale lui A. N. S e v e r ț o v). În acest sens, fiecare ontogeneză reunește trecutul, prezentul și viitorul.

Cît de vechi ar fi (filogenetic) formațiunile sau funcțiile reproduse de ereditate, cît de puțin cunoscut procesul de „interiorizare" a factorilor care au prezidat la geneza acestora în complexul embrionar, — ele se realizează (concret) în decursul unei dezvoltări individuale numai datorită înlănțuirii unor procese actuale prezente în complexul embrionar. Dar fiecare dintre aceste procese este numai termenul cel mai recent al unei lungi serii evolutive, istorice.

De aceea, aplicarea metodelor de cercetare istorice descriptiv comparative în studiul ontogenezei, pe lîngă cele experimentale și ecologice este indispensabilă.

Funcțiile necesare vieții și dezvoltării embrionului pot avea două feluri de corespondenți morfologici :

1) organe care de la începutul și pînă la sfîrșitul ontogenezei reprezintă unicul sau principalul corespondent morfologic al funcției, și

2) complexe organice afectate unor funcții similare, însă repartizate pe componenți topografic despărțiți și în unele cazuri morfologic diferiți, care ajung la maturitatea lor funcțională în diferite epoci ale procesului ontogenetic, aparținînd totuși unuia și aceluiași complex funcțional.

Componenții pot să coexiste, însă în diferite grade de diferențiere morfo-funcțională.

Putem numi aceste complexe de organe embrionare homeofuncționale (un fel de organe analoge în unul și același organism), în sensul că ele stau în slujba aceleiași funcții sau unei funcții asemănătoare, cînd ajung la desăvîrșirea diferențierii lor specifice.

Avem deci de-a face aci cu organe care îndeplinesc același gen de funcții, însă în perioade ontogenetice diferite (uneori și simultan), și care se dezvoltă în regiuni diferite ale complexului embrionar.

Aici, funcția își are corespondentul morfologic reprezentat de cîte cel puțin un cuplu de organe, format din doi parteneri (sau eventual mai mulți), dintre care unul se poate afla în deplină diferențiere morfo-funcțională, satisfăcînd necesitățile funcționale ale momentului ontogenetic în complexul embrionar, celălalt aflîndu-se încă departe de desăvîrșirea structurii și funcției sale specifice, ceea ce nu exclude însă îndeplinirea altor funcții („preadulte"). Partenerul, încă nediferențiat pentru funcția sa specifică, nu poate fi considerat ca un corp străin în sînul interacțiunilor și interdependențelor mereu în dezvoltare ale complexului embrionar, care — toate la un loc — se confundă, în acest moment, cu înseși forțele motrice ale dezvoltării individuale.

Nu putem admite organe embrionare prefuncționale, afuncționale. Pînă la atingerea pragului morfo-funcțional adult, organele embrionare pot avea interrelații și funcții care diferă cantitativ sau calitativ de cele definitive. Organul embrionar este totdeauna rezultatul necesar al interacțiunilor întregului complex embrionar și, la rîndul său, un factor în acest complex, manifestîndu-și astfel funcția. În felul acesta, fiecare organ embrionar trece prin mai multe faze funcționale, pînă la apariția fazei funcției specifice, adică asemănătoare cu aceea a organismului pe deplin dezvoltat.

Ca exemplu de cuplu homeofuncțional putem cita corion-alantoida și plămînul.

Începînd cu a opta zi de incubație, organul respirator principal și suficient al embrionului de pasăre este corion-alantoida. Ea coexistă însă cu celălalt organ respirator, plămînul, care se diferențiază încet de-a lungul ontogenezei embrionare și ajunge la funcția sa specifică „adultă" la scurt timp înaintea eclozìunii, cînd embrionul începe să respire din camera de aer. În acest moment începe regresul corion-alantoidei.

În exemplul citat, cei doi parteneri ai cuplului homeofuncțional sînt organe diferite, topografic depărtate, unul intra- și celălalt extraembrionar (amîndouă organele sînt însă evaginații ale intestinului embrionar).

În cazul mezo- și metanefrosului avem de-a face cu o succesiune, în timp și spațiu, de purtători ai funcțiilor excretoare, topografic despărțiți. Aici însă succesiunea se face mai devreme, în timpul ontogenezei embrionare preeclozionale, iar ambii parteneri ai cuplului aparțin corpului embrionar.

Indiferent dacă considerăm întreaga masă nefrogenă (pro-mezo- și metanefrosul) un „holonefros" unic, care se diferențiază și se adaptează succesiv în direcția cranio-caudală, sau dacă considerăm cele trei generații de rinichi ca formațiuni de sine stătătoare, în ambele cazuri avem de-a face — spre deosebire de ficat, inimă etc. — cu o separare, și în timp, și în spațiu, a organelor care îndeplinesc funcții omoloage și se succed în procesul dezvoltării ontogenetice.

Este însă important că mezo- și metanefrosul nu se înlocuiesc în mod strict și coexistă la un moment dat, formînd un cuplu simultan, compus dintr-un organ excretor, care funcționează în plin — cum vom arăta mai jos — și care este adaptat cerințelor actuale ale complexului embrionar (mezonefrosul), și un al doilea organ (metanefrosul), care coexistă, topografic despărțit de primul, însă care nu a ajuns încă la diferențierea sa specifică. Acest cuplu trece apoi și printr-o fază de funcție specifică simultană a ambilor parteneri. Embrionul nu prezintă o inimă simplă în plină funcție, lîngă care — topografic despărțită — s-ar diferenția încet o altă inimă septată. Aici diferențierea se petrece, în mod continuu, într-unul și același organ. (Exemplu de „organ unic").

Noi am ales ca obiect de studiu un cuplu homeofuncțional în sensul expus mai înainte, și anume cuplul mezo-metanefros, deoarece credem că un complex de organe embrionare de acest tip prezintă pentru cercetarea experimentală deosebite avantaje față de organe „unice" de tip inimă, ficat etc.

Experimentarea cu un asemenea cuplu de organe ar putea duce la elaborarea unei metodici utile pentru identificarea proceselor ontogenetice în complexul embrionar, care contribuie la diferențierea unui organ în prezența partenerului său homeofuncțional precursor, încă suficient față de cerințele complexului embrionar.

Faptul că, în cuplul studiat, faze ontogenetice morfo-funcționale diferite sînt repartizate simultan pe organe diferite, topografic separate, oferă într-adevăr experimentării o suprafață de atac favorabilă. Observînd simultan componentul diferențiat și cel nediferențiat, intervenind asupra unuia sau celuilalt, ni se oferă următoarele posibilități :

1) Putem studia direct efectul contradicțiilor care se dezvoltă între componenții unui cuplu homeofuncțional (de exemplu, declinul mezonefrosului și avîntul metanefrosului).

2) Putem să întreprindem încercări de modificare a dezvoltării normale a contradicțiilor dintre partenerii cuplului homeofuncțional, legate de schimbarea tipului de metabolism, în faza declinului unuia dintre componenți, variind condițiile de dezvoltare ale embrionului.

În această direcție, cercetările noastre se desfășoară în două etape :

I. În prima etapă am studiat, împreună cu C. R î m n i c e a n u și C. M i c l e a, caracteristicile morfo-funcționale ale mezo- și metanefrosului de-a lungul ontogenezei embrionare, folosindu-ne de mai multe metode capabile să evidențieze aspectele funcționale ale celor două generații de rinichi. Acesta este obiectul cercetărilor redate în acest capitol.

II. Vom face, în etapa a doua, în momente de tranziție funcțională, intervenții asupra metabolismului general al embrionului sau intervenții directe asupra mezo- sau metanefrosului și vom urmări efectele acestora asupra evoluției ulterioare a dezvoltării.

CERCETĂRI ASUPRA CUPLULUI HOMEOFUNCȚIONAL MEZO- ȘI METANEFROS

Cercetările noastre, în colaborare cu C. R î m n i c e a n u și C. M i c l e a, au fost făcute pe 440 de embrioni de găină rasa Leghorn alb, începînd cu embrioni de 4 zile de incubație și pînă la ecloziune.

Metodele de evidențiere a funcțiilor renale embrionare folosite au fost în parte metode utilizate și de alți cercetători (albastru de tripan și roșu neutru etc.), în parte, metode originale. Aplicînd metodele vechi, noi nu urmărim numai verificarea datelor cunoscute, ci căutăm să creăm o bază experimentală pentru cercetările noastre din a doua etapă, al căror scop a fost enunțat mai înainte.

Am utilizat ca metode de cercetare a funcțiilor mezo- și metanefrosului: acumularea albastrului de tripan, eliminarea roșului neutru, eliminarea acidului uric, concentrarea și eliminarea indigocarminului, reacția fosfatazei alcaline ca indicator funcțional, resorbția glucozei și depozitarea de glicogen, fluorescența proprie.

a) Înmagazinarea albastrului de tripan constituie una din vechile metode utilizate pentru stabilirea funcției renale. Această metodă a fost folosită de mulți cercetători, mai ales pentru studiul funcțiilor mezonefrosului la animale la care acesta constituie organul definitiv (la amfibieni, W. v. M ö l l e n d o r f, 1918, la larvele de salamandră, K. P e t e r, 1924, ș.a.). Încă la sfîrșitul secolului trecut, B a k u n i n a cercetat prin injecții de albastru de tripan funcția renală la embrionul de găină, de asemenea B. S c h n e i d e r (1939).

În cercetările noastre, albastrul de tripan a fost administrat în diluții diferite, de 1 : 30 ; 1 : 60 ; 1 : 200, în soluție cloruro-sodică izotonică, pe membrana vasculară vitelină și pe corion-alantoidă, cîte 0,05 ml într-o singură injecție, și embrionii au fost examinați după 24 de ore, și de încă două ori la cîte două zile interval, și embrionii au fost examinați la 24 și 48 de ore de la ultima administrare. Materialul a fost examinat proaspăt la lupa binoculară, la microscop cu obiectivul 7 și pe secțiuni histologice în serie. La seria de embrioni la care s-a administrat albastru de tripan chiar în diluții mai mari, la 3 zile de incubație, am avut o mortalitate de 100%.

Apariția unor granule de tripan în celulele mezonefrosului a fost evidentă între a cincea și a șasea zi de incubație, la embrionii care au primit albastru de tripan în diluția de 1 : 60 și au fost examinați la 24 de ore după administrare. Examinînd la lupa binoculară materialul proaspăt, se observă o colorație intens albastră a corpului Wolff la nivelul unora dintre tubii rinichiului ; alții prezintă o colorație slabă, în timp ce alți tubi rămîn incolori (fig. 314). La obiectivul 7 se constată prezența unor granule fine de albastru de

tripan, răspîndite în toată citoplasma celulelor tubilor contorți, iar la polul lor bazal, aceste granule se dispun în scurte bastonașe, dînd astfel celulei renale un aspect striat (fig. 315). Imaginea este identică și pe preparatele fixate.

Între a șaptea și a noua zi de incubație, acumularea albastrului de tripan în mezonefros devine mai intensă (fig. 316). Pe materialul proaspăt, privit la lupa binoculară și la microscop cu obiectivul 7, unii tubi apar colorați în albastru și alții în violet. Prin electroforeză am verificat opinia cercetătorilor T. Suzuki (1912), W. v. Möllendorf (1915), S. Steckelmacher (1918) asupra existenței în constituția albastrului de tripan a doi coloranți, cît și asupra acumulării lor inegale la nivelul celulelor renale. Făcînd electroforeza albastrului de tripan, am constatat că acest colorant este format din doi componenți de culoare diferită, care nu acționează simultan, ci succesiv, asupra epiteliilor renale [1]).

Atît pe materialul proaspăt, cît și pe cel fixat și examinat pe secțiuni în serie, s-a observat că granulele de tripan apar mai mari și mai puține în porțiunea apicală a celulelor tubilor contorți ; la polul lor bazal, aceste granule sînt mai numeroase, au un aspect mai puțin net de bastonașe și se situează și pe laturile nucleului (fig. 317). În a 12-a zi de incubație, granulele de albastru de tripan iau, în cea mai mare parte, aspectul unor bastonașe dispuse bazal și pe laturile nucleului, iar în porțiunea apicală sînt extrem de rare sau lipsesc (fig. 318). Aceste aspecte se mențin pînă după a 14-a zi de incubație, cînd apar și primele semne ale degenerescenței unor tubi mezonefrotici (fig. 319).

De asemenea se găsește și dubla colorație — în albastru și violet — a diferiților tubi contorți (fig. 320).

De la a 14-a zi de incubație, atît pe material proaspăt, cît și fixat, se observă o diminuare a acumulării albastrului de tripan. Granulele sînt mai puțin numeroase, mai mari și colțuroase. În jurul tubilor degenerați și al epiteliilor degenerate, pătrunzînd chiar în peretele tubului, se observă aglomerări de histiocite încărcate cu albastru de tripan (fig. 321), observație care confirmă concepțiile lui Mecinikov în legătură cu fagocitarea de către histiocite a organelor larvare în regres.

Procesele degenerative în mezonefros se accentuează, astfel că din ziua a 16-a a incubației degenerescența interesează și o parte din glomeruli, dar mai ales porțiunile inițiale ale unor tubi contorți. Citoplasma celulelor acestor tubi are aspect vacuolar, nucleii sînt picnotici sau foarte palizi, iar acumularea albastrului de tripan se face sub forma unor granule mari, grosolane, fără orientare, răspîndite inegal în celulă. Numărul histiocitelor care invadează regiunile degenerate crește, iar citoplasma lor este încărcată cu granule mari de albastru de tripan.

Între a opta și a noua zi de incubație se schițează metanefrosul, sub aspectul unor tubi scurți, răspîndiți în țesutul mezenchimal, situat dorsal față de mezonefros. În această perioadă nu se observă încă glomerulii ; prezența lor este evidentă din a 11-a zi de incubație. Metanefrosul proaspăt, examinat la lupa binoculară, indică prezența albastrului de tripan abia la 13 zile de incubație, pe porțiuni limitate ale unor tubi ; acumularea se face sub formă de granule fine de tripan, răspîndite la întreaga citoplasmă a celulelor, fără orientare. Din ziua a 13-a de incubație, acumularea albastrului de tripan se intensifică treptat. Granulele devin mai mari și se orientează mai ales la polul bazal.

Această variație de mărime a granulelor de albastru de tripan este considerată de mulți autori în corelație cu intensitatea activității funcționale a celulelor.

---

[1]) Cercetările de electroforeză au fost efectuate de Gh. Oțetea.

Este de semnalat prezența unui mare număr de histiocite purtătoare de granule de tripan în metanefros, în perioadele cînd acumularea în celulele renale nu este încă evidentă.

b) Pentru decelarea funcției de eliminare a rinichiului embrionar am folosit și metoda colorației vitale cu roșu neutru. Această metodă a fost utilizată în cercetările funcției renale a unor vertebrate de o serie de autori (R e g a u d și P o l i c a r d în 1902, R. H ö b e r în 1909 ș.a.). Nu cunoaștem însă lucrări care să fi utilizat această metodă la embrionul de găină.

Pentru noi, colorația vitală cu roșu neutru a constituit și un mijloc de evidențiere a secreției acidului uric.

Am administrat roșul neutru în diluții de 1 : 100 ; 2 : 100 și 1 : 1 000, cîte 0,05 și 0,1 ml, pe membrana vasculară vitelină și pe corion-alantoidă. Examenul a fost făcut după 30 de minute, 60 de minute, 1 oră și jumătate și 24 de ore, iar la embrionii mari (17 zile) s-a repetat doza și au fost observați după 7 ore. Oferind embrionilor roșu neutru, am constatat prezența unor incluzii de culoare roz-gălbuie în citoplasma celulelor tubilor contorți, între a cincea și a șasea zi de incubație. Aceasta denotă existența unei funcții de concentrație în citoplasmă, care este urmată de o colorație vitală. Cu roșu neutru am reușit să colorăm, în albastru violaceu, sferoliții de acid uric din lumenul unor tubi de calibru mare. Această colorație, care contrastează cu aceea a incluziilor din citoplasma celulelor, denotă reacția slab alcalină în citoplasma celulelor epiteliale și reacția intens acidă a conținutului tubilor.

c) Eliminarea acidului uric a fost constatată de noi începînd cu a cincea sau a șasea zi de incubație, sub formă de cristale sferice necolorate, colorabile electiv cu roșu neutru. Cristalele acestea au aspectul unor sfere de diferite dimensiuni, cu o structură interioară radiară (fig. 322) și o dispoziție în lanțuri mai mult sau mai puțin discontinue. Ele se găsesc în lumenul unor porțiuni ale nefronului cu calibru mai mare. Am verificat natura acestor sferoliți prin proba cu hidrat de sodiu, care dizolvă instantaneu aceste sferocristale. Făcînd și proba Folin-Denis, am constatat că este vorba de cristale de acid uric. Metoda cu roșu neutru poate fi deci folosită cu succes pentru decelarea mai ușoară a sferoliților de acid uric.

În metanefros, apariția sferocristalelor de acid uric am înregistrat-o la embrionul de 13 zile de incubație.

De remarcat faptul că în mezonefros, de la începutul apariției lor, sferoliții sînt mari pe cînd în metanefros, în nici un stadiu al evoluției embrionare, ei nu ating aceste dimensiuni.

Eliminarea acidului uric, atît în mezo-, cît și în metanefros, este ritmică și, în consecință, aspectele microscopice arată localizări diferite, după momentul funcțional în care este surprins acest proces. Eliminările se fac în cantități variabile. Uneori cristalele sînt așezate în șiraguri fine în lumenul tubilor, alteori se găsesc aglomerări masive în ultimele porțiuni ale tubilor colectori (fig. 323). În mezonefros, eliminarea este masivă între a 16-a și a 18-a zi (fig. 324 și 325), iar în metanefros, în ultimele zile ale incubației (fig. 326).

Din a 14-a zi de incubație se observă în alantoidă mase albicioase care, la examenul microscopic, au arătat că nu sînt altceva decît cristale de acid uric. În ultimele zile de incubație, la embrionii cărora li s-a administrat albastru de tripan, se observă în alantoidă și eliminarea — o dată cu sferocristalele de acid uric — a detritusurilor celulare rezultate din degenerescența tubilor (nefronilor mezonefrosului) și a albastrului de tripan, care dă întregii mase eliminate o culoare albastră.

d) Injecții intravasculare cu indigocarmin 1%, 0,5 ml, prin membrana papiracee în vena alantoidiană, ne-au pus în evidență funcția de concentrare și eliminare a rinichiului embrionar. Examenul, făcut la lupa binoculară la 5 minute după injecție, ne-a arătat că mezonefrosul elimină și concentrează, la vîrsta de 14 zile, indigocarminul, în timp ce metanefrosul concentrează și elimină în această perioadă cantități mult mai reduse și după un timp ceva mai îndelungat de la injectare (fig. 327).

e) Pentru a studia funcțiile renale embrionare am cercetat și fluorescența mezo- și metanefrosului în lumina violetă și ultravioletă filtrată (Wood). Fluorescența mezonefrosului apare pentru prima dată la embrionul de 6 zile de incubație (fig. 328), iar la metanefros, începînd cu a 13-a zi de incubație. Fluorescența se accentuează pe măsură ce procesul de dezvoltare ontogenetică embrionară înaintează. De semnalat că, atît în mezo-, cît și în metanefros, numai tubii sînt fluorescenți, contrastînd cu glomerulii nefluorescenți (fig. 329).

Cu această ocazie am urmărit și fluorescența celorlalte organe embrionare și am constatat că, în afară de mezo- și metanefros, care prezintă cea mai mare fluorescență, ficatul și gonadele, și mai tîrziu și tegumentul și penele, prezintă și ele o fluorescență proprie, dar diferită de aceea a mezo- și metanefrosului (fig. 330, 331 și 332).

f) Fosfataza alcalină a fost pusă în evidență prin metode Gömöri, modificată de D o r f f m a n n - E p s t e i n (anexa II). Apariția, localizarea și intensitatea reacției la rinichiul embrionar ne-au servit drept criterii funcționale specifice. Noi am stabilit pe baza unui bogat material embrionar, semnificația funcțională a acestei reacții, atît în sistemul nervos, glandele endocrine, cît și la celelalte organe embrionare. Localizarea fosfatazei alcaline în nucleu, de intensitate medie, am interpretat-o ca semnalînd un proces morfogenetic; localizarea în citoplasmă sau localizarea atît în citoplasmă, cît și în nucleu a fosfatazei alcaline, cu o intensitate maximă, denotă o stare funcțională specifică, activă.

Fosfataza alcalină apare la mezonefrosul embrionului de 5 zile de incubație, localizată atît la nivelul nucleilor, cît și în porțiunea citoplasmatică apicală a celulelor tubilor contorți. Intensitatea este maximă la nivelul membranei polului apical. În unii tubi, numai nucleul posedă o reacție de intensitate medie la fosfataza alcalină, iar alți tubi sînt negativi (fig. 333).

Pe măsura dezvoltării mezonefrosului, tubii contorți cu reacție intens pozitivă la nivelul membranei apicale devin tot mai numeroși. Din ziua a 14-a de incubație, cînd apar procesele degenerative, tubii nu mai prezintă reacția fosfatazei alcaline.

Metanefrosul, a cărui apariție este netă între a opta și a noua zi de incubație, prezintă din a zecea zi de incubație un aspect caracteristic. Primordiile conductelor excretoare, reduse ca număr, prezintă o slabă reacție fosfatazică la nivelul nucleilor. La capătul orb al acestor primordii, țesutul metanefrogen, care va da naștere capsulei Bowman și părții secretoare al nefrosului, formează o scufiță cu o reacție fosfatazică mai intensă la nivelul nucleilor, detectînd acolo un proces morfogenetic activ. Țesutul mezenchimal, încă nediferențiat, prezintă o slabă reacție.

În a 11-a zi de incubație, țesutul metanefrogen, devenit mai bogat, prezintă aceeași reacție (fig. 334). Nefronii sînt la această vîrstă constituiți. Un număr redus de tubi contorți arată, la nivelul membranei apicale a celulelor, o reacție intens pozitivă, indice al unui proces funcțional activ specific. La această vîrstă, deci, procesul de creștere este foarte marcat, dar procesul funcțional specific este încă limitat numai la puțini tubi contorți.

Începînd cu a 12-a zi de incubație, noii nefroni prezintă aspecte funcționale specifice, interpretate pe baza localizării și intensității reacției fosfatazei alcaline. Glomerulii sînt

negativi, nucleii celulelor celor două foițe ale capsulei sînt pozitivi. Spre sfîrșitul incubației, reacția relevă o netă diferențiere funcțională a diferitelor segmente ale nefronului. Corpusculii renali rămîn permanent negativi, în afară de nucleii celulelor endoteliale ale capsulei. Tubul contort, chiar din prima lui porțiune, prezintă o reacție intens pozitivă la marginea apicală a celulelor; restul citoplasmei este slab pozitiv, iar nucleii negativi. În unii tubi contorți, însă, aspectul este diferit: marginea în perie a celulelor este negativă, iar citoplasma, în porțiunea apicală și pe laturile nucleului, este intens pozitivă, nucleii rămînînd negativi; în alți tubi cantorți, aspectul diferă numai prin aceea că și unii nuclei sînt pozitivi. Aceste aspecte le interpretăm ca activități funcționale diferite ale tubilor.

Se remarcă o scădere a intensității reacției în porțiunea apicală a celulelor, pe măsură ce ne îndepărtăm de tubul contort, mergînd pînă la totala negativare la nivelul tubilor colectori.

g) Prin metoda Sabadaș s-a evidențiat prezența glicogenului în mezonefros la embrionul de 5 zile de incubație. Glicogenul apare atît la nivelul marginii apicale a celulelor tubilor contorți, cît și în granule foarte fine la baza acestor celule. De remarcat că prezența glicogenului nu se poate decela la nivelul celorlalte porțiuni ale nefronului. Aceste aspecte sînt constante în tot timpul perioadei preeclozionale. La vîrste mai înaintate (13 zile de incubație) se observă glicogen și în celulele endoteliale ale unor corpusculi renali.

În metanefros, prezența glicogenului se remarcă pentru prima dată la embrionul de 13 zile de incubație, dar numai în celulele unui număr foarte restrîns de tubi contorți, cu același aspect și topografie ca mezonefrosul.

Glomerulii metanefrosului rămîn de dimensiuni mult mai reduse față de glomerulii mezonefrosului (fig.335).

Cercetările efectuate de noi pînă acum ne permit a afirma că semne incontestabile de funcție specifică le găsim în mezonefros de timpuriu, în a cincea zi de incubație. Acumularea albastrului de tripan în celulele tubilor contorți ai mezonefrosului, la această dată, denotă o funcție specifică renală: se știe că acumularea de tripan constituie o funcție caracteristică renală la vertebratele adulte. Prin prezența sferoliților de acid uric, eliminarea acestei substanțe este neîndoielnică din a șasea zi de incubație. Acidul uric la păsări este un produs specific al metabolismului final al proteinelor. La păsări, acidul uric este rezultatul unui proces de sinteză care are loc în ficat și rinichi (K o ș t o i a n ț). Deci, la 6 zile de incubație, mezonefrosul îndeplinește o funcție de sinteză și de eliminare a acidului uric. Sinteza acidului uric la păsări pornește de la amoniac (S c h u l e r și R e i n d e l). N e e d h a m, prin cercetări analitice la embrionul de găină, stabilește un vîrf al absorbției proteinelor și al eliminării azotului total la 5 zile de incubație, cît și eliminarea de amoniac. Datele noastre pot fi deci corelate cu afirmațiile lui N e e d h a m.

Eliminările renale, sub formă de acid uric, fac posibilă o mare economie de apă, necesară pentru menținerea în soluție a sărurilor, în urina mamiferelor. Acest caracter adaptativ specific al păsărilor apare deci foarte de timpuriu în ontogeneză.

Prezența reacției fasfatazei alcaline, de intensitate mare la nivelul membranei apicale a celulelor tubilor contorți, prezența glicogenului la polul apical și la polul bazal al acelorași celule, demonstrează că din a cincea zi de incubație celulele tubilor contorți îndeplinesc funcția de resorbție a glucozei și de punere a ei în rezervă sub formă de glicogen. Perioada aceasta (a cincea-a șasea zi de incubație) coincide și cu apariția fluorescenței spontane în mezonefros.

Constatăm deci că, între a cincea și a șasea zi de incubație, mezonefrosul prezintă, în mod indubitabil, funcții caracteristice renale : comportarea față de coloranți electronegativi, sinteză, eliminare și concentrare. Mezonefrosul a ajuns în această perioadă la posibilitatea de a îndeplini funcțiile sale specifice. Acestor funcții le corespunde și aspectul condriomului, care a început să se orienteze în bastonașe la polul bazal al celulelor tubilor contorți.

Menționăm că Chambers, lucrînd cu roșu de fenol, a observat eliminarea acestui colorant chiar la 4 zile de incubație.

În perioada descrisă mai sus, metanefrosul nu este încă morfologic distinct.

Comportarea epiteliilor renale față de albastrul de tripan, reacția fosfatazei alcaline, fluorescența proprie și aspectele condriomului ne permit să afirmăm că funcțiile renale ale mezonefrosului se intensifică cantitativ, atingînd un plafon între a 8 și a 9 zi de incubație. În acest moment, metanefrosul este schițat morfologic sub aspectul de tubi a căror structură histologică contrastează net cu aceea a mezonefrosului : lipsa de glomeruli diferențiați, lumen strîmt și celule bazofile, pe cînd în mezonefros glomerulii sînt mari, lumenul tubilor larg, cu celule acidofile.

În această perioadă de intensă activitate a mezonefrosului, metanefrosul coexistă morfologic, fără a manifesta încă nici una din funcțiile sale specifice : lipsa acumulării de tripan, lipsa de sferoliți de acid uric, de fosfatază alcalină, de glicogen, de fluorescență proprie.

Cuplul homeofuncțional mezo-metanefros este caracterizat, în acest moment, prin existența unui partener în plină activitate specifică, în timp ce al doilea partener se află în diferențierea morfologică, fără a manifesta *funcțiile specifice.* Acest lucru nu înseamnă lipsa de funcție a metanefrosului în acest moment ; cercetările noastre viitoare se vor îndrepta spre elucidarea tipului de funcție îndeplinit de metanefros în perioada aceasta, adică a contribuției lui la sistemul de interacțiune din complexul embrionar. Ea poate fi calitativ diferită de funcțiile specifice renale.

Primul semn funcțional pozitiv care apare în metanefros constă în reacția fosfatazei alcaline și prezența glicogenului în celulele tubilor contorți în a 11-a zi a incubației, înaintea apariției celorlalte manifestări funcționale specifice. În consecință, considerăm prezența fosfatazei alcaline drept un fenomen precursor al instalării funcțiilor specifice ale organului. Funcțiile specifice apar în succesiunea următoare : acumularea albastrului de tripan, minimă în a 13-a zi, este netă în a 14-a zi a incubației ; cristalele de acid uric apar în a 13-a zi ; fluorescența, slabă în a 13-a zi, este evidentă începînd din a 14-a zi ; injecția intravenoasă de indigocarmin la 14 zile permite, în mod clar, aprecierea simultană a puterii de concentrare și eliminare a cuplului mezo-metanefrotic. Ea este intensă la mezonefros, și abia indicată la metanefros.

Raportul dintre mezonefros și metanefros, în această perioadă, se schimbă față de prima perioadă descrisă. Ambii parteneri posedă acum semne de funcție specifică (noi nu știm dacă aceste funcții sînt îndeplinite în mod identic, dar ele se observă la ambii parteneri). Diferențele se manifestă prin aspectele variate ale granulelor de albastru de tripan și ale eliminării de acid uric : granule mari în mezonefros, fine și sub formă de bastonașe scurte în metanefros. Sferoliții în mezonefros sînt mari și orientați în șiraguri, mulînd canalele excretoare, în timp ce în metanefros sînt mai mici, mai denși și mai puțini la număr.

Dezvoltarea funcției specifice la metanefros coincide cu începutul regresului mezonefrosului, regres care se manifestă prin invazia de macrofage, acumularea de epitelii descuamate în lumenul unor tubi, cu toate că în alte porțiuni ale organului constatăm chiar figuri mitotice.

Aspectul cuplului mezo-metanefrotic indică, în acest moment, începutul unei perioade de trecere în metabolismul complexului embrionar, care se manifestă morfofuncțional în comportarea celor două organe renale coexistente. Cu toate că mezonefrosul continuă să-și manifeste funcțiile sale specifice, procesul de degenerescență ia din ce în ce mai multă amploare, în timp ce metanefrosul manifestă semne funcționale din ce în ce mai intense.

Lăsăm aici la o parte aspectele legate de trecerea unei părți a mezonefrosului în slujba aparatului genital.

Folosind mai multe metode pentru aprecierea funcțiilor specifice renale, am analizat dezvoltarea raporturilor dintre partenerii unui cuplu de organe embrionare homeofuncționale de-a lungul procesului ontogenetic preeclozional.

Aceste observații vor constitui puncte de plecare pentru cercetări experimentale în cursul cărora vom interveni asupra embrionului în timpul fazei de trecere, fie modificînd particularități ale metabolismului embrionului, fie acționînd direct asupra epiteliilor renale.

În această primă etapă a cercetărilor noastre, asupra dezvoltării funcției mezo- și metanefrosului, am procedat — conform metodicii obișnuite a embrio-fiziologiei — la stabilirea momentului cînd apar funcțiile specifice renale în mezo- și metanefros, funcții asemănătoare cu cele ale organului deplin dezvoltat.

În a doua etapă de cercetări — care este în curs — căutăm să stabilim diferențele structurale fine (ultrastructurale) dintre mezo- și metanefros, folosindu-ne de seruri specifice antimetanefros, obținute prin injecția de triturat sau extract de rinichi adult de găină la iepure.

De asemenea se studiază efectul „supraîncărcării" embrionului, fie cu țesut mezonefrotic, fie cu țesut metanefrotic, prin implantări în diferite momente ale dezvoltării a celor două generații de rinichi.

Împovărarea experimentală a embrionului cu un surplus de amoniac, uree sau acid uric, în momentul apariției metanefrosului, va putea contribui — credem — la cunoașterea unor corelații între metabolismul și morfogeneza generală a embrionului și în special a mezo- și metanefrosului.

BIBLIOGRAFIE

1. Koștoianț H. S., *Fiziologie comparată*, București, Ed. med., 1954.
2. Menkes B., Rîmniceanu C. și Miclea C., *Cercetări asupra dezvoltării și funcțiunii mezonefrosului și metanefrosului la embrionul de găină*, Studii și cercetări științ. Acad. R.P.R., Baza Timișoara, Seria științe medicale, 1956, t. III, nr. 1–2, p. 9.
3. Mîrza V., Rîmniceanu C., Miclea C., Lungulescu M. și Litvac B., *Interrelațiile dintre vitelus și embrionul de găină. Fosfataza alcalină și reacția Feulgen în ontogeneza embrionului de găină*, Bul. științ. Acad. R.P.R., Secțiunea de științe medicale, 1952, t. IV, nr. 4, p. 845.
4. Möllendorf W., *Handb. d. Mikr. Anat. d. Menschen*, 1930, t. VII/1, p. 166.
5. Needham J., *The Metabolism of the Developing Egg*, Physiol. Rev., 1925, vol. V, nr. 1, p. 58.
6. Parhon C. I., *Biologia vîrstelor. Cercetări clinice*, Ed. Acad. R.P.R., 1955.





Fig. 314. — Embrion de 6 zile de incubaţie. *a* — Mezonefros. Albastru de tripan. Examen proaspăt la lupa binoculară. Nuanţele închise reprezintă concentraţia colorantului. *b* — Tubi mezonefrotici din *a*.

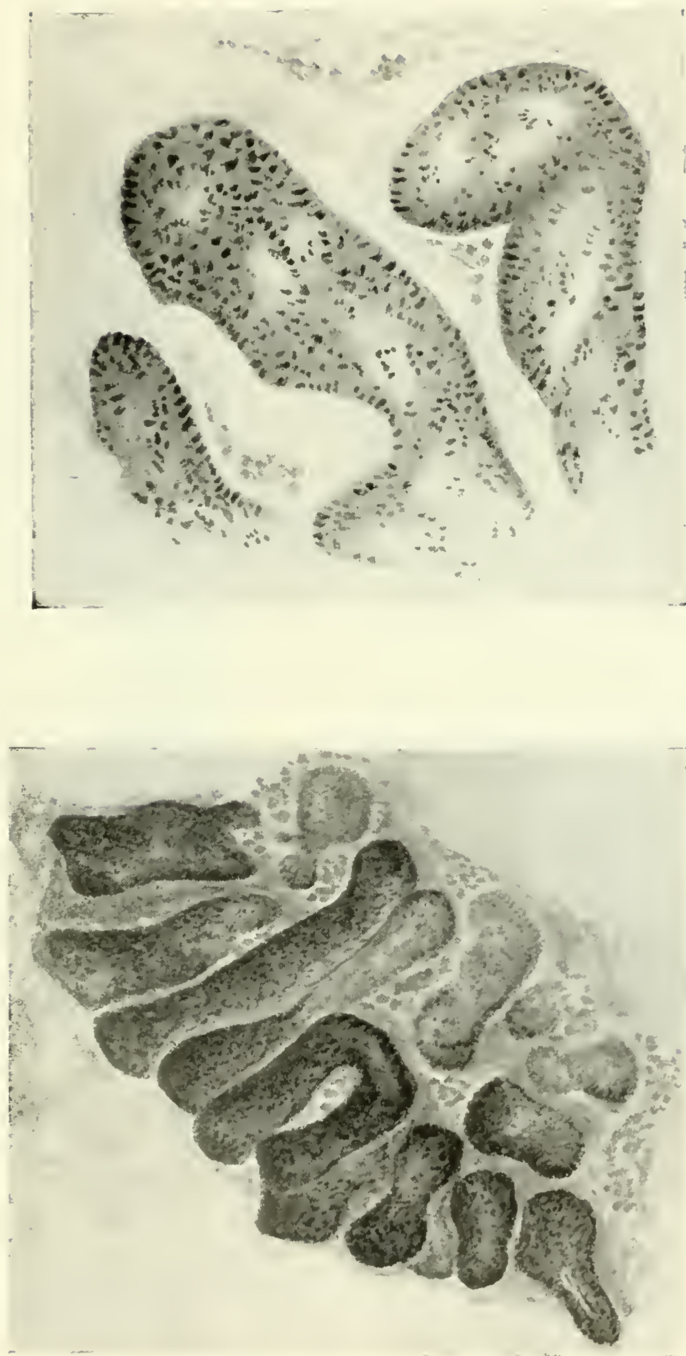


Fig. 315. — Aceeași explicație ca în fig. 314. *a* — ob. 3, oc. 6. *b* — ob. 7, oc. 6.

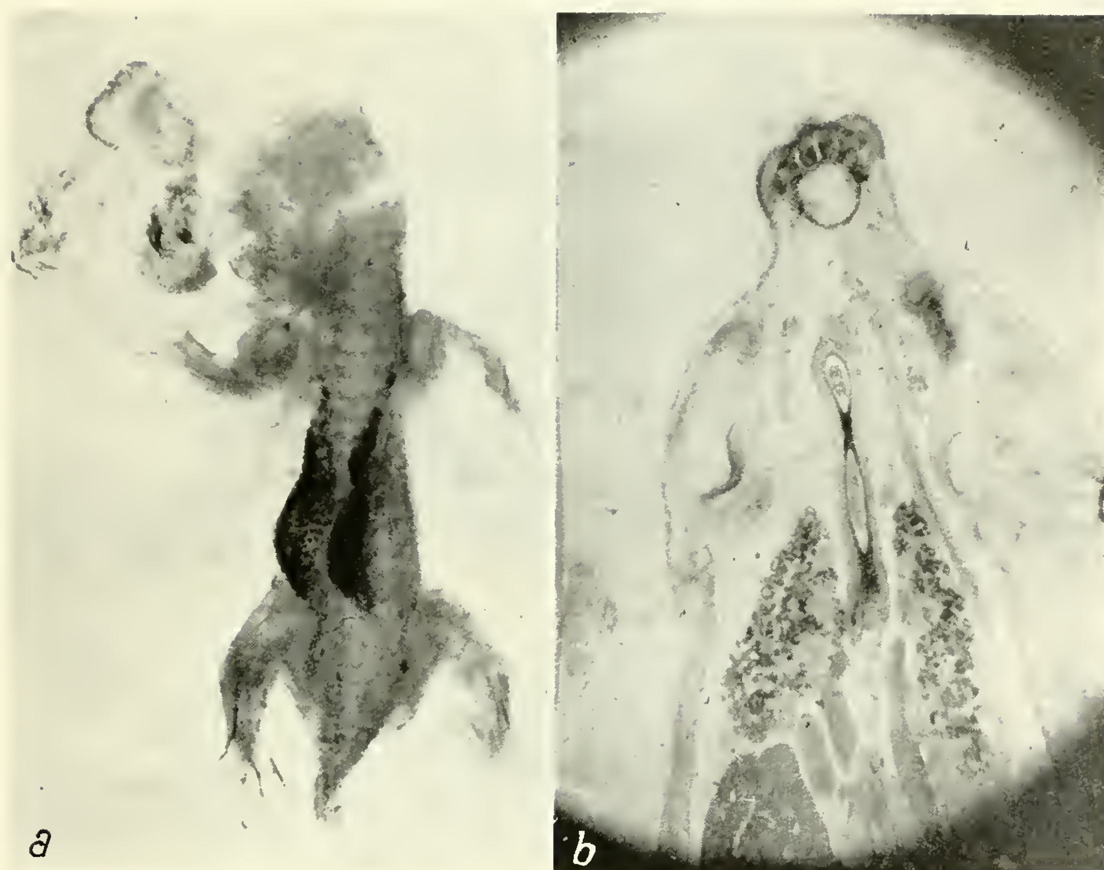


Fig. 316. — *a* — Embrion de 7 zile; albastru de tripan. Mezonefrosul încărcat cu colorant. Vedere la lupă. *b* — Secțiune printr-un embrion de 8 zile de incubație; reacția fosfatazei alcaline pozitivă la nivelul tubilor metanefrotici.



Fig. 317. — Secțiune printr-un tub contort mezonefrotic cu granule de albastru de tripan. Ob. imersie, oc. 6.



Fig. 318. — Secțiune prin tubi mezanefrotici la un embrion de 12 zile; granule de albastru de tripan numai în tubii contorți; *ob.* imersie, oc. 5.

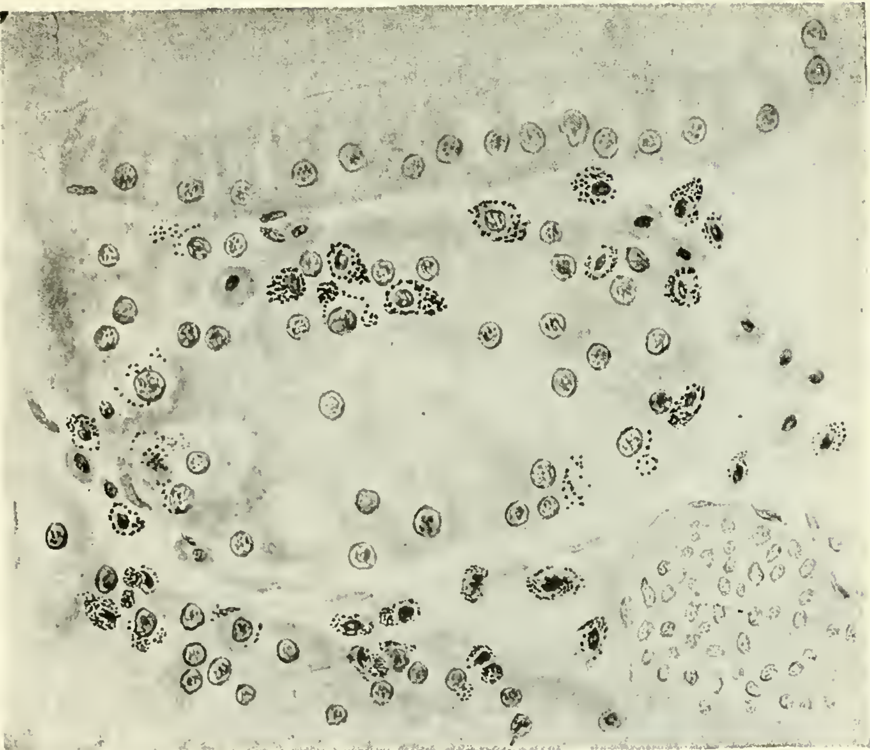
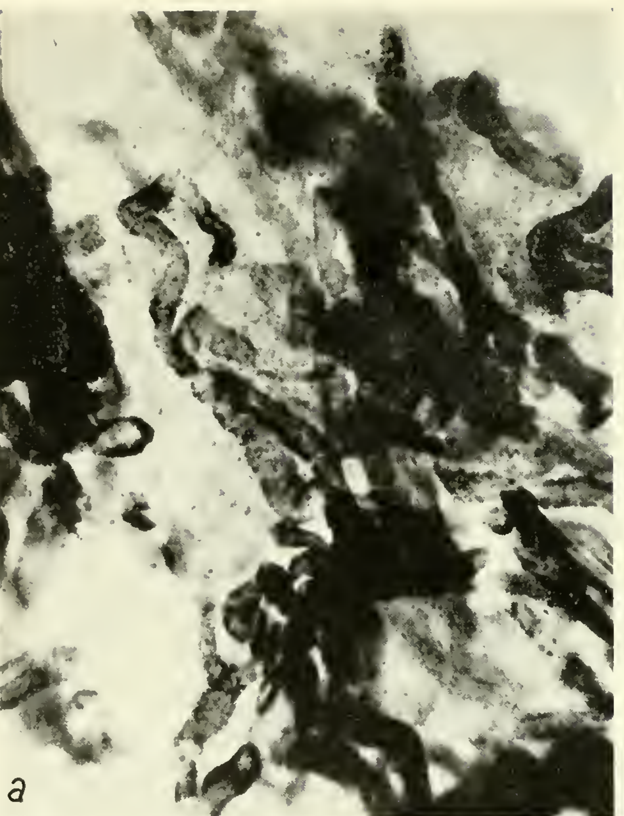


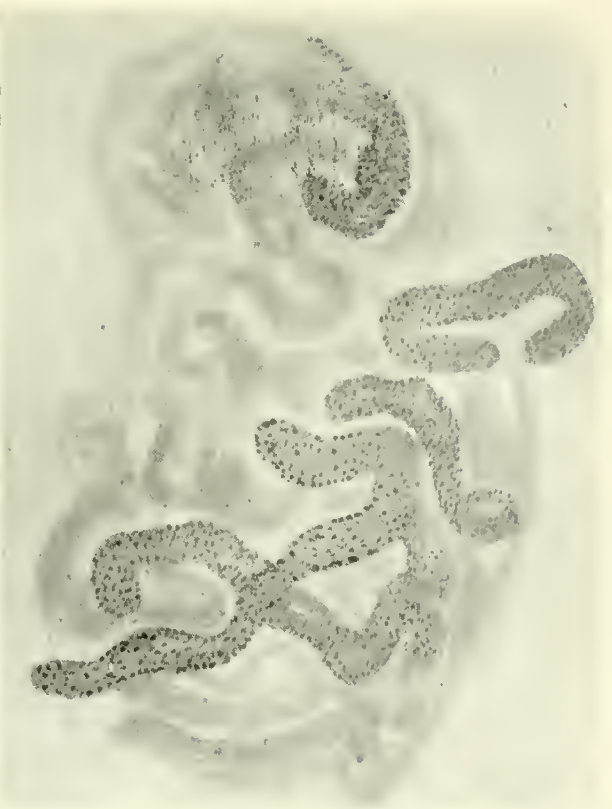
Fig. 319. — Aspecte de degenerescență a unor tubi contorți din mezonefrosul embrionului de 15 zile incubație; ob. imersie, oc. 5.



Fig. 320. — Dubla colorație a nefronilor cu albastru de tripan. Porțiunile colorate în albastru apar pe figură în nuanțe închise, iar cele colorate în violet apar în nuanțe mai deschise.



a — fotografie.



b — desen.

Fig. 321. — Metanefros. Embrion de 17 zile de incubaţie ; albastru de tripan. Material proaspăt la lupa binoculară.

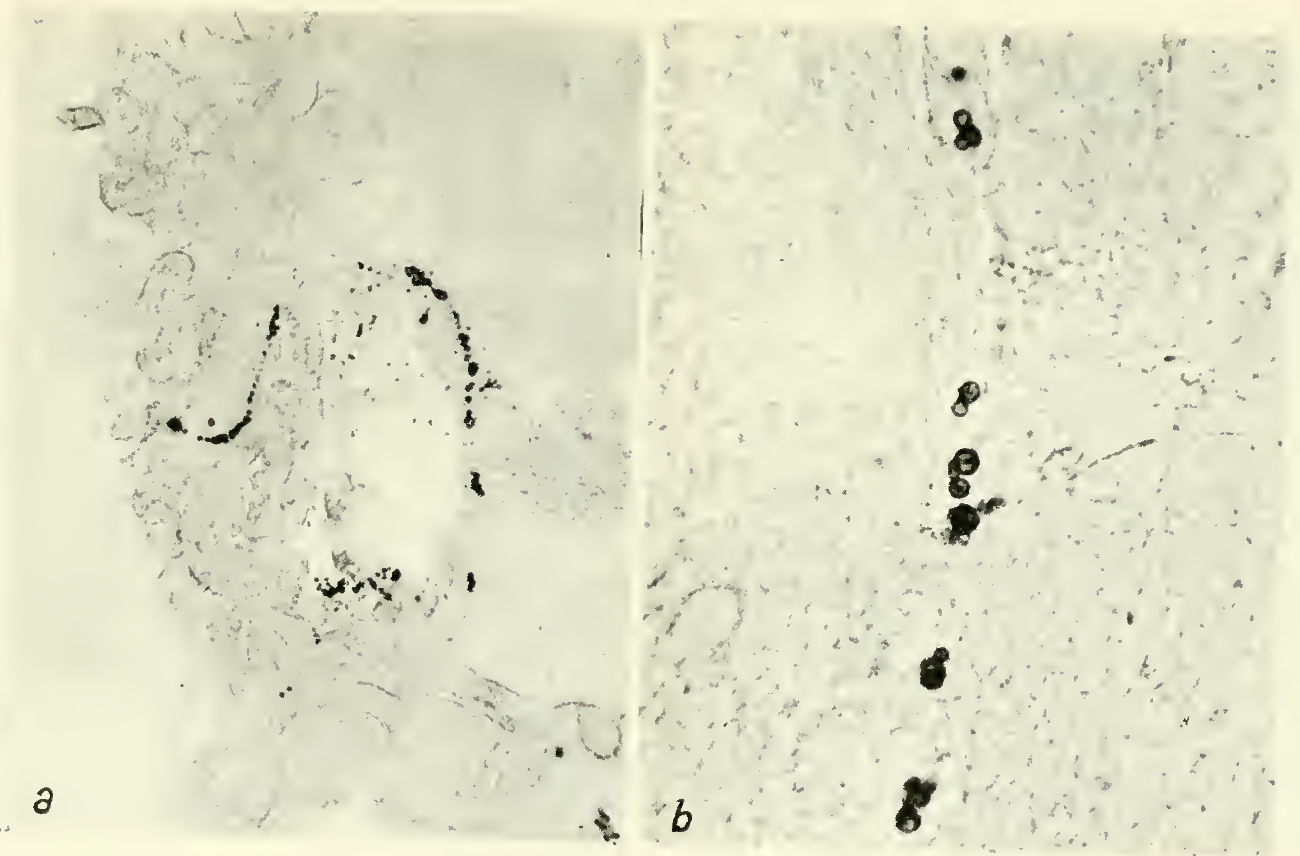


Fig. 322. — Embrion de 7 zile de incubație. Sferocristale de acid uric în lumenul unui tub colector. Colorație roșu neutru; *a* ob. 3, oc. 5; *b* ob. imersie oc. 5.

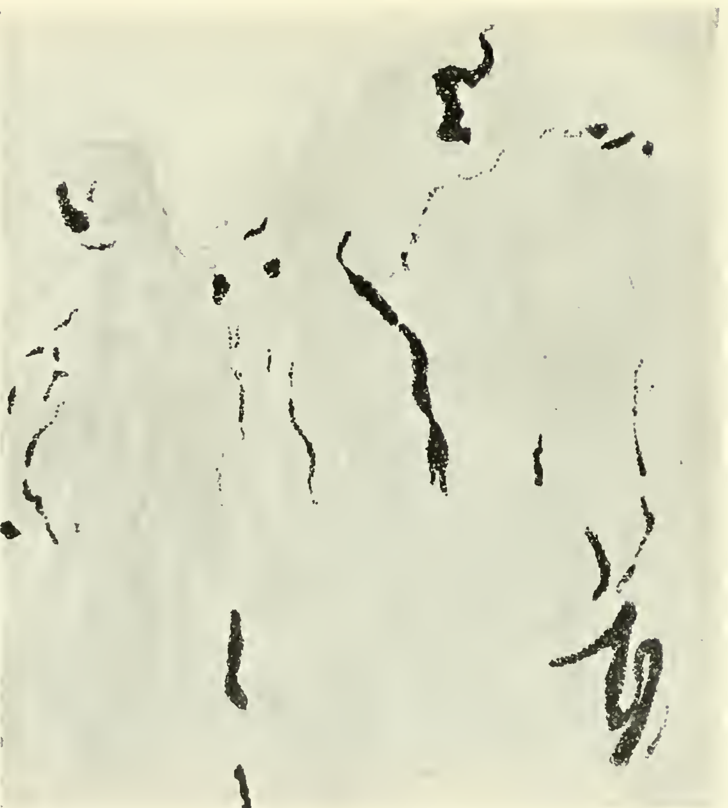


Fig. 323. — Aglomerări masive de sferocristale de acid uric în mezonefrosul embrionului de 16 zile de incubație; ob. lupă, oc. 5.



Fig. 324. — Un aspect din preparatul anterior, văzut cu ob. 7.

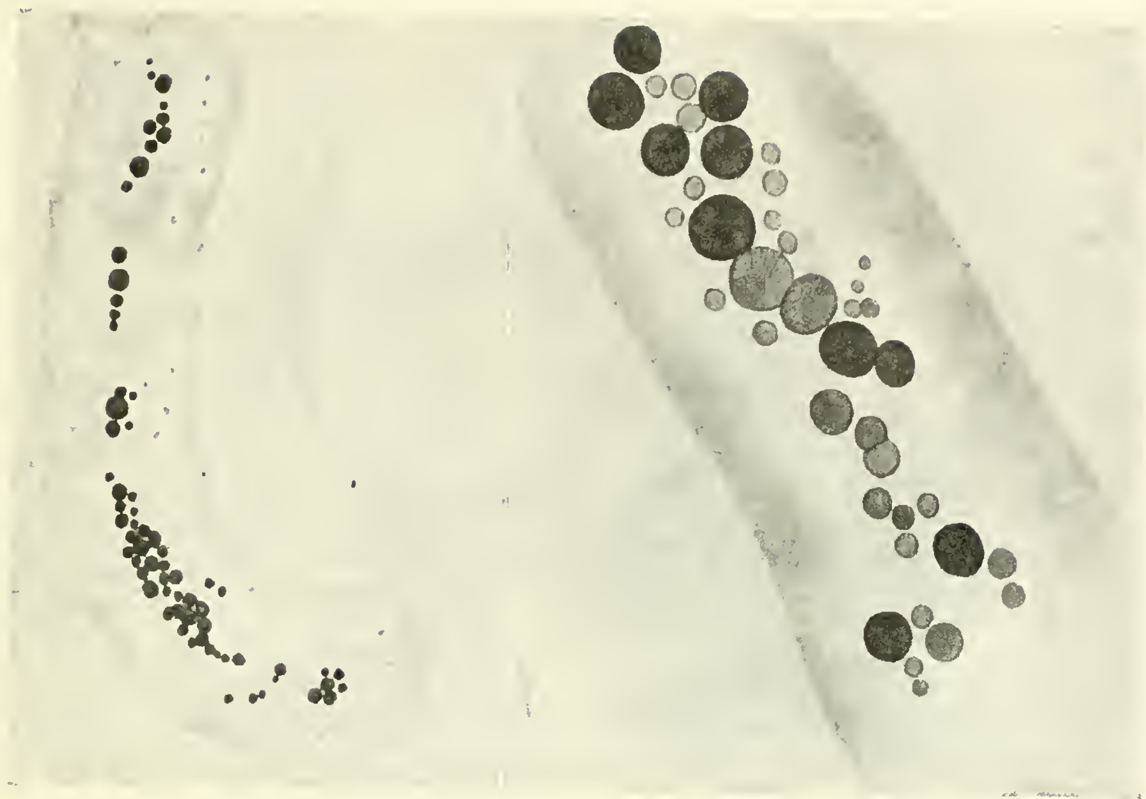


Fig. 325. — *a* şi *b* — Sferocristale colorate cu roşu neutru.

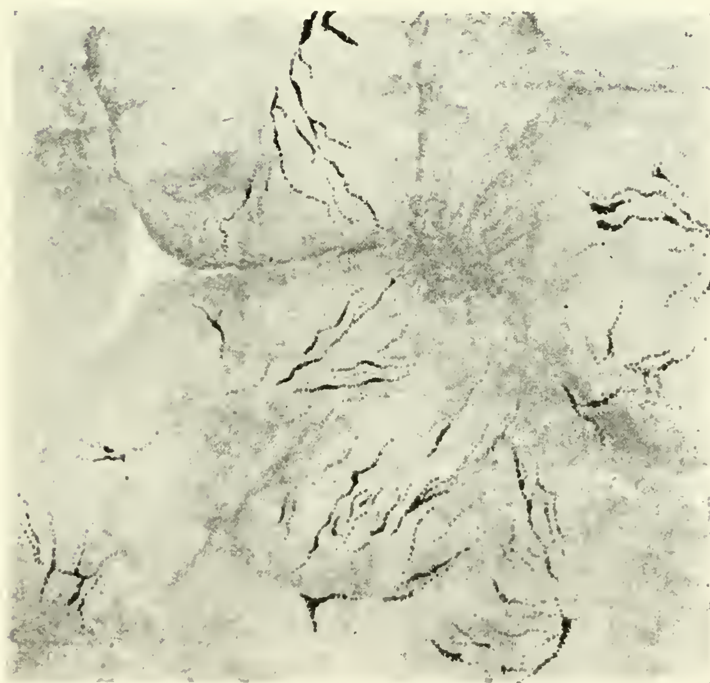


Fig. 326. — Dispoziţia cristalelor de acid uric în metanefros.



Fig. 327. — Eliminarea indigocarminului (mezonefros).



Fig. 328. — Fluorescența mezonefrosului la un embrion de 6 zile de incubație.

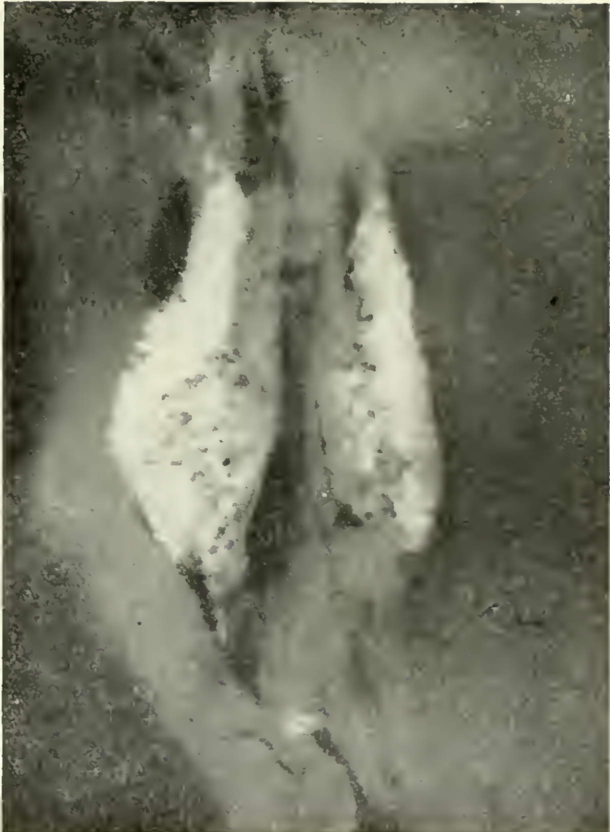


Fig. 329. — Fluorescența mezonefrosului la un embrion de 7 zile de incubație.



Fig. 330. — Embrion de 13 zile. Fluorescența mezonefrosului (dr.); ușoară fluorescență a metanefrosului (st.).

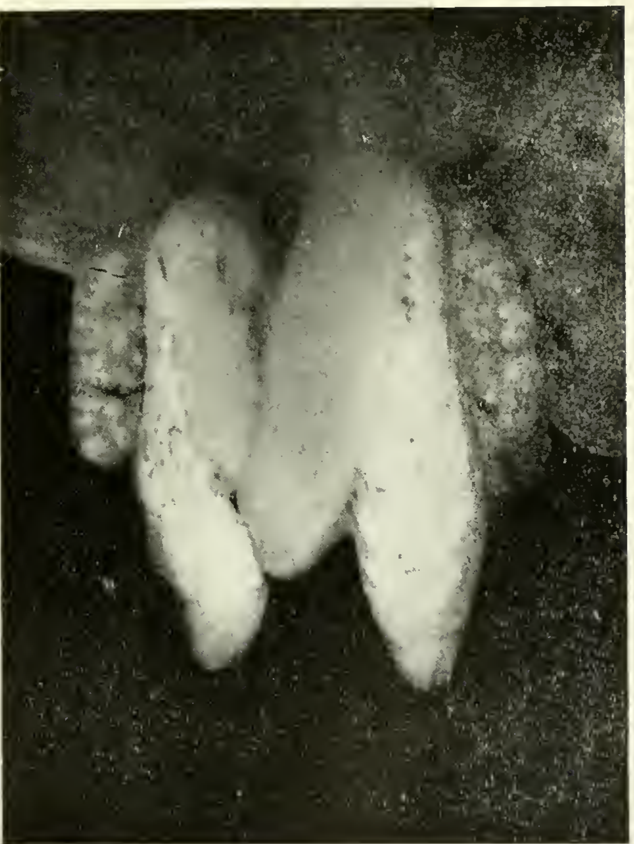


Fig. 331. — Embrion de 14 zile de incubație. Fluorescență în mezo- și metanefros.

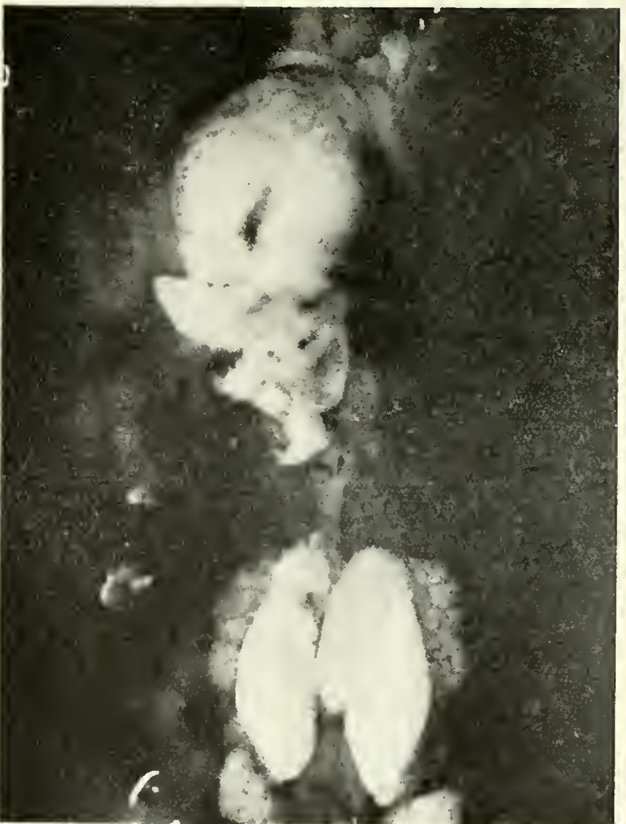


Fig. 332.—Embrion de 15 zile incubaţie. Fluorescenţa mezo- şi metanefrosului. Ficatul şi gauadele fluorescente.

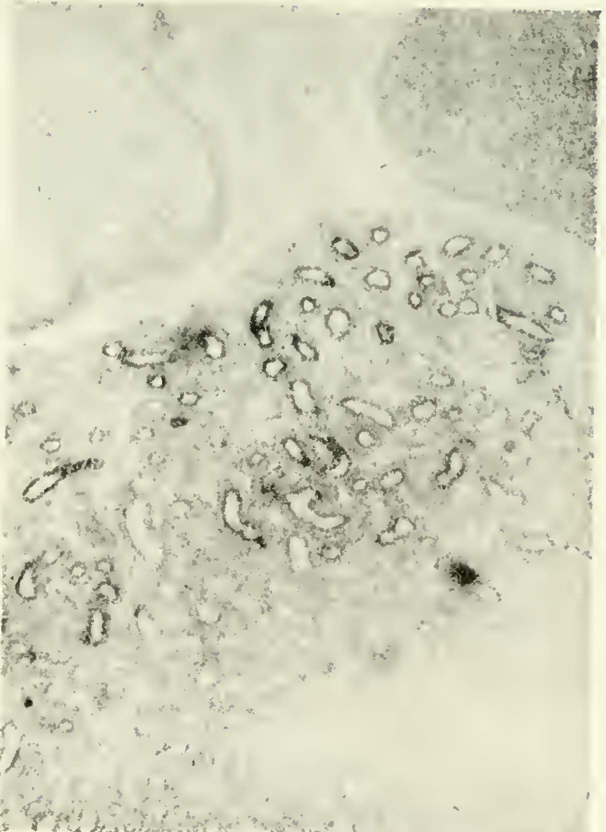


Fig. 333. — Reacţia fosfatazei alcaline la nivelul mezonefrosului embrionului de 5 zile de incubaţie.

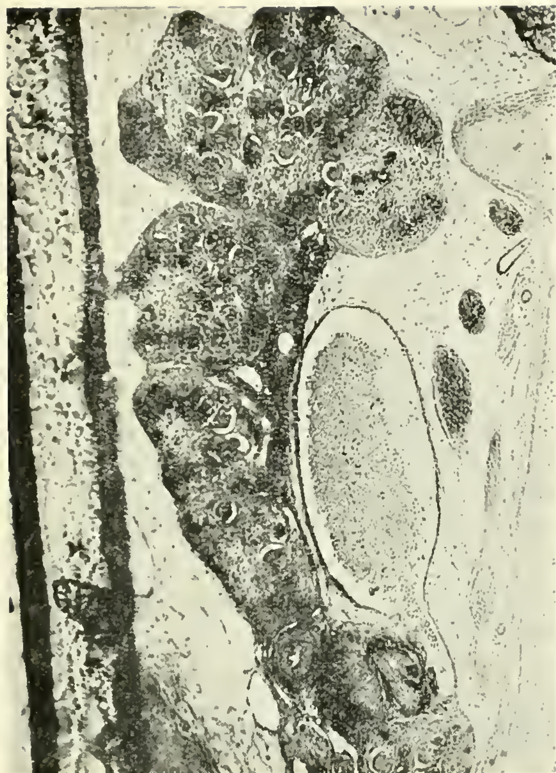


Fig. 334. — Reacţia fosfatazei alcaline la nivelul metanefrosului embrionului de 11 zile de incubaţie ; ob. lupă.



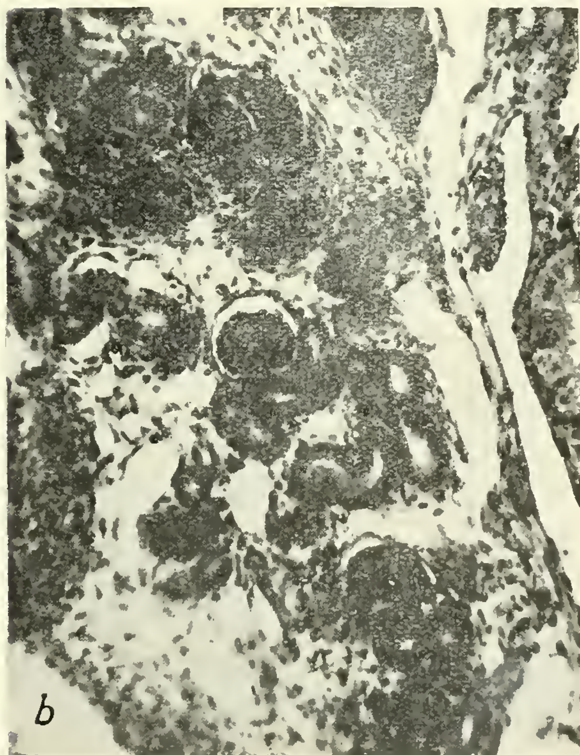


Fig. 335. — Aspecte comparative între glomerulii mezonefrosului (*a*) şi metanefrosului (*b*) la embrionul de 17 zile de incubaţie.

CERCETĂRI ASUPRA CUPLULUI FICAT - COMPLEX VITELIN ȘI ASUPRA FUNCȚIILOR ALTOR ORGANE EMBRIONARE

C. R î m n i c e a n u și C. M i c l e a au abordat studiul unui alt cuplu homeofuncțional, în sensul expus mai sus, compus pe de o parte din ficatul embrionului de găină și, pe de alta, din complexul format de membrana vitelină, endodermul vitelin și vitelusul adiacent endodermului vitelin, considerate ca ,,ficat tranzitoriu''.

Pînă în a șasea zi de incubație se poate vorbi de existența unui fel de ,,preficat'', reprezentat de aceste organe embrionare, deoarece numai ele prezintă, pînă în acest moment, în complexul embrionar, funcția glicogenetică (și de rezervor de glicogen).

Din a șasea zi de incubație, și ficatul propriu-zis începe să-și manifeste funcția glicogenetică. Începînd deci cu această dată, ambii componenți ai cuplului glicogenetic considerat prezintă această funcție, ficatul rămînînd singurul organ de rezervă de substanțe glucidice destinate întregului organism, abia către sfîrșitul incubației.

Studiind dezvoltarea funcțională a pancreasului la embrionul de găină, C. R î m n i c e a n u și C. M i c l e a au stabilit că abia după a 15-a zi de incubație se poate observa diferențierea morfologică a pancreasului endocrin.

Trecînd la studii experimentale, acești cercetători au introdus, în embrionul de găină de 4 zile de incubație, un extract obținut din pancreasul embrionului de găină între a 9-a și a 14-a zi de incubație, deci înaintea diferențierii sale morfologice ca organ endocrin. Ei au observat cu această ocazie, că extractul obținut din acest organ înainte ca acesta să fi ajuns la diferențierea sa morfologică poate determina apariția prematură a funcției glicogenetice a ficatului, (stabilită de R î m n i c e a n u și M i c l e a la a șasea zi de incubație). Într-adevăr, ficatul embrionilor tratați cu acest extract reacționa pozitiv la metoda Sabadaș într-a patra și a cincea zi de incubație.

C. R î m n i c e a n u și C. M i c l e a, cercetînd apariția, localizarea și intensitatea reacției histochimice a fosfatazei alcaline la embrionul de găină, au observat că apariția diferențierii morfologice este precedată, la unele organe, ca ficatul, tiroida, hipofiza etc., de reacția pozitivă a fosfatazei alcaline în citoplasma celulelor acestor organe.

În preajma diferențierii morfo-funcționale au deci loc importante schimbări metabolice, detectate în parte prin apariția acestei enzime, cu rol deosebit de important în morfogeneza și geneza funcțiilor specifice.



Pe linia cercetării treptelor funcționale pe care le parcurg diferite organe în perioada embrionară pînă la atingerea funcției specifice (pragul funcțional adult), menționăm aici observațiile făcute împreună cu M. D e l e a n u în legătură cu fenomene de secreție apocrină observate în mucoasa gastrică a embrionului de găină.

La unii viermi (*Aphrodite aculeata*), moluște și unele insecte (*Dictyoploca japonica*), celulele epiteliale ale tubului digestiv sînt eliminate total sau parțial, în lumenul intestinal, unde participă la procesul de digestie extracelulară, punînd în libertate fermenți. La aceste animale se observă, în consecință, valuri de regenerare și multiplicare a celulelor epiteliale ale mucoasei tractului digestiv, în legătură cu fazele procesului de digestie.

Acest tip de comportare a epiteliilor tubului digestiv a fost denumit *secreție morfokinetică*, spre deosebire de *secreția morfostatică*, la care, în timpul secreției, integritatea corpului celular se păstrează.

La embrionul de găină am găsit în epiteliul stomacal aspecte morfologice ale tipului de secreție apocrină, apărînd în ziua a 10-a de incubație, dar mai ales în a 12-a zi, moment care coincide cu trecerea embrionului în stadiul fetal al ontogenezei preeclozionale, etapă în care embrionul, așa cum au arătat G. A. Ș m i d t și M. N. R a g o z i n a, începe să înghită albușul venit în amnios prin canalul sero-amniotic (fig. 336 și 337).

Cercetările noastre au fost făcute pe secțiuni în serie, de embrioni Leghorn în vîrstă de 8, 10, 12 și 16 zile de incubație.

În a zecea zi de incubație, celulele epiteliului cilindric multistratificat din stomacul muscular arată, la polul apical, fine prelungiri, de dimensiuni reduse (fig. 338).

În a 12-a zi de incubație, în stomacul embrionului de găină se găsește un conținut stratificat, care este rezultatul activității părții glandulare a stomacului, la care se adaugă probabil și albușul înghițit (fig. 336 și 337).

Mucoasa stomacului muscular posedă un epiteliu multistratificat cilindric, fără elemente glandulare. Celulele stratului superficial al epiteliului stomacului muscular prezintă la polul apical prelungiri cu aspectul unor cili, la care deosebim diferite faze de detașare a lor de corpul celulei și de înaintare înspre masa conținutului gastric (fig. 337).

Prelungirile celulare de la polul apical se fragmentează, formînd o masă granulară care se amestecă cu conținutul gastric (fig. 337). În afară de aceste prelungiri protoplasmatice, celulele epiteliului gastric prezintă unii nuclei împinși spre apexul celular (fig. 339) și chiar aspecte de eliminare de nuclei, care se fragmentează, alături de prelungirile protoplasmatice ale celulelor în contact cu conținutul stomacal.

Presupunem că părțile eliminate din celulele epiteliale participă la procesul de digestie a conținutului gastric prin eliminare de fermenți. Astfel ne credem îndreptățiți să omologăm fenomenul observat de noi cu tipul de secreție morfokinetică amintit mai sus.

Observația descrisă reprezintă exemplul unei faze funcționale a unui organ embrionar apărînd înaintea instalării formei specifice și definitive a funcției acestuia. În această ordine de idei putem cita și un alt exemplu.

Începînd cu ziua a șaptea zi de incubație se pot observa, la epiteliile bronșice și ale canalelor epiteliale pulmonare, fenomene de secreție care se aseamănă foarte mult cu secreția apocrină a unor glande cu secreție externă, cum ar fi de pildă glanda mamară adultă. Nu cunoaștem încă soarta acestor secreții eliminate de epiteliile respiratoare embrionare în lumina tubilor bronșici. Nu este exclusă o resorbție ulterioară a acestora și pătrunderea lor în mediul intern al embrionului.

Poate că suntem aici în fața unei funcții a primordiului organului respirator, încă departe de momentul apariției funcției sale specifice, a unei funcții care intră în categoria celor preadulte, despre care a fost vorba în capitolul introductiv (fig. 340).

BIBLIOGRAFIE

1. R î m n i c e a n u C., M i c l e a C. și D r ă g a n M., *Glicogeneza în cursul dezvoltării embrionului de găină.* Bul. științ. acad. R.P.R., Secția de științe medicale, 1955, t. VII, nr. 3, p. 959.
2. R a g o z i n a M. N., *Modul de nutriție și respirație a păsărilor domestice în diferite perioade ale dezvoltării în cursul incubației.* Analele romîno-sovietice, Zootehnie și medicină veterinară, 1956, an. X, seria VI-a, nr. 1, p. 48.
3. K o s t o i a n ț, H. S, *Fiziologie comparată,* București, Ed. med., 1954.

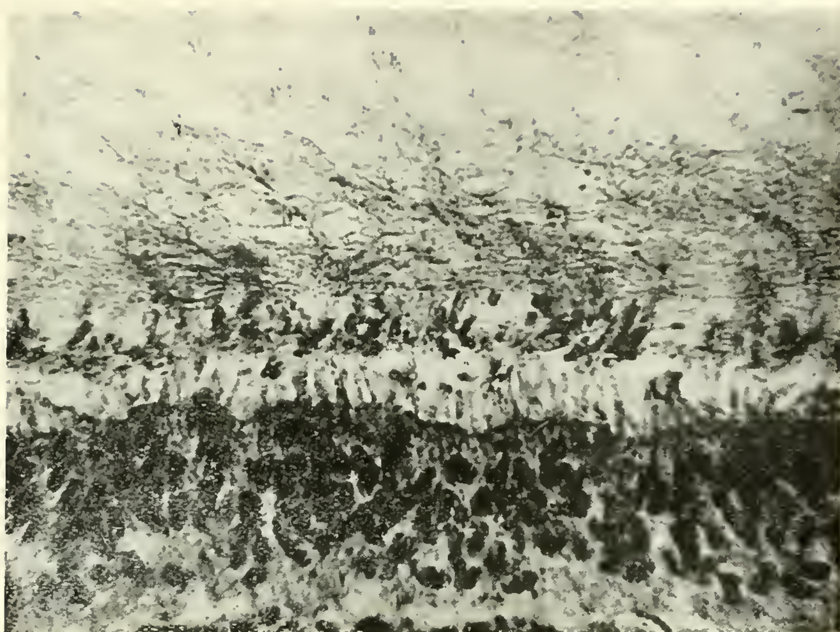


Fig. 336. — Mucoasa gastrică a embrionului de găină de 12 zile de incubaţie. Fenomenul de secreţie merocrină.

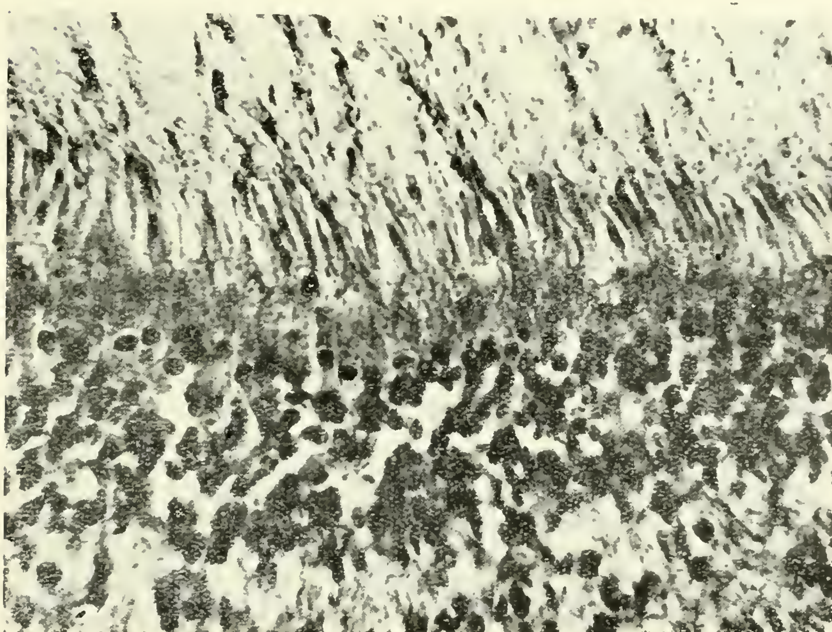


Fig. 337. — Fragmentarea secreţiei şi amestecul ei cu conţinutul gastric în stomacul muscular la embrionul de găină de 12 zile de incubaţie.



Fig. 338. — Epiteliul mucoasei gastrice la 10 zile de incubaţie. Apar fine picături de secreţie la apexul celulelor.

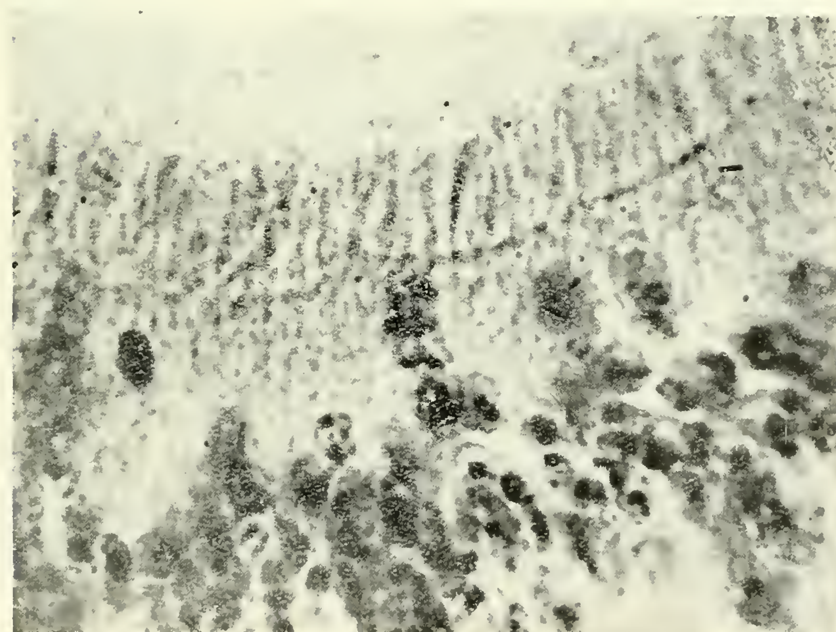


Fig. 339. — Mucoasa gastrică a embrionului de găină de 12 zile de incubaţie. În timpul mitozei, nuclei înaintează spre apexul celulelor.



Fig. 340. — *a* și *b* — Fenomene de secreție ale epiteliilor pulmonare, la embrionul de găină de 7 zile de incubație.

DESPRE FUNCŢIILE MECANICE ALE UNOR ORGANE EMBRIONARE

În timpul dezvoltării embrionului iau naştere forţe mecanice (presiuni, tensiuni, tracţiuni) care participă ca factori activi (mai cu seamă în anumite perioade) în acest proces.

Creşterea volumului unor organe embrionare, tensiunea lichidelor care se adună în formaţiuni cavitare, contracţiile musculaturii care apar la scurtă vreme după diferenţierea ei, tracţiunile ritmice ale inimii, creşterea unor regiuni întregi ale corpului embrionar în anumite direcţii etc. fac să se nască în sînul organismului embrionar forţe mecanice care se transmit celulelor, fibrelor şi constituenţilor semilichizi şi lichizi, căpătînd astfel importanţă în multe procese morfogenetice (W. Roux, Triepel, Benninghoff, F. Rainer etc.)

În capitolele precedente am expus observaţiile noastre asupra prezenţei unei tensiuni longitudinale, care se manifestă în corpul embrionului de găină în a doua zi de incubaţie, legată de diferenţierea organelor axiale, tensiune care contribuie la închiderea tubului neural.

În a treia zi, acesteia îi succedă o tracţiune transversală, care, cum s-a spus (vezi „Mieloschizis"), favorizează, de exemplu, persistenţa unei redeschideri a tubului neural, executată în această perioadă.

Tot astfel, după redeschiderea tubului neural, organele axiale, vecine cu tubul neural, cum sînt : somitele, ganglionii rahidieni, arcurile vertebrate, prezintă importante modificări, care demonstrează că diferenţierea lor normală este legată de forma normală a tubului neural.

Cercetările pe care le-am întreprins, distrugînd globul ocular al embrionului (vezi capitolul „Intervenţii asupra sistemului nervos embrionar") au arătat că simetria masivului facial depinde, în mare măsură, de presiunile pe care cei doi globi oculari le exercită asupra celorlalte formaţiuni ale craniului şi de echilibrul presiunilor acestor globi. Exemplele citate, al căror număr poate fi multiplicat, ilustrează importanţa factorilor mecanici în procesele de ontogeneză. Modul de acţiune intim al acestor factori rămîne un important obiect de studiu în embriologia experimentală.

În timpul celei de-a doua zile de incubaţie se diferenţiază în sînul corpului embrionar, un organ pulsatil, relativ mare, tubul cardiac. Contracţiile lui ritmice se transmit formaţiunilor adiacente, determinînd reacţii morfogenetice adecvate, de deosebită importanţă. Aceste tracţiuni sînt transmise în primul rînd de mezenchimul care leagă tubul cardiac de intestinul cefalic (faringele), mezenchim care formează aici un fel de mediastin embrionar. Mai tîrziu, contracţiile miocardului se transmit, în mod foarte evident, asupra veziculelor telencefalice, ajunse din cauza curburii nucale şi verticale în contact cu sacul pericardic în partea ventrală a corpului embrionar.

Solicitarea reactivităţii mezenchimului, prin tracţiuni ritmice, stîrneşte un răspuns adecvat, şi anume : diferenţierea ţesutului precolagen şi a celui elastic. Pe baza cercetărilor pe care le vom expune în acest capitol ne credem îndreptăţiţi a afirma că aici forţele mecanice reprezintă factori concreţi, actuali, care determină diferenţierea mezenchimului şi orientarea sa spaţială. Apariţia localizată a formaţiunilor elastice, pe care le vom descrie, în regiunea împovărării mecanice maxime, nu are caracterul de a fi hotărîtă de vreo genă locală. Din multiplele posibilităţi prospective ale mezenchimului, aici se realizează unele, favorizate de prezenţa unui complex de factori actuali, izvorîţi din sistemul de interacţiuni al complexului embrionar.

În cele ce urmează vom rezuma rezultatele cercetărilor pe care le-am întreprins împreună cu regretatul nostru maestru, Francisc Josef Rainer, asupra formării țesutului elastic la embrionul de găină.

Ca material de lucru au fost folosite ouăle rasei Leghorn. Coaja subțire a ouălor acestei rase permite cu ușurință stabilirea (prin transluminație) a poziției embrionului și a ariei vasculare, necesară pentru așezarea ferestrelor și a altor manipulări.

După 2—15 zile de incubare la 38°, embrionii au fost fixați în Carnoy, Susa (Heidenhain), Maximov, formol neutru. Seriile au fost colorate pentru elastină după metodele clasice : 1) orceină (formula Pranter), (care colorează elementele elastice electiv după fiecare din fixările utilizate) ; 2) rezorcină-fucsină. Colorația cu orceină a putut fi combinată cu azur-eozină (Maximov) și Azan (Heidenhain) pentru evidențierea raporturilor elementelor elastice cu cele colagene.

Pentru evidențierea fibrilelor argentofile s-au făcut impregnări argentice după metoda Agdur. Seriile au fost desenate, fotografiate, grafic și plastic reconstruite. Au fost examinați cca. 800 de embrioni (inclusiv observațiile mișcărilor, transplantări și alte manipulări). În afara metodei ferestrei am folosit, pentru observarea și manipularea embrionilor vii, metoda lui H. Volmar, care permite accesul, manipularea și observarea comodă a embrionului viu *in vitro* și care ne-a devenit indispensabilă, constînd în „transvazarea" (în condiții sterile) a conținutului oului după două zile de incubație într-un vas de sticlă de formă corespunzătoare, ținut la termostat în atmosferă umedă (vezi capitolul „Tehnica"). În unele cazuri, rare, am putut menține în viață, în asemenea condiții, embrionii pînă la 15 zile.

Pentru observația mișcărilor transmise de inimă regiunilor învecinate, ne-am servit de colorația vitală cu roșu neutru. Observațiile s-au făcut cu lupa binoculară. S-au făcut explantări de inimi pe corion-alantoidă și pe sacul vitelin (după tehnica V. Dantschakoff).

Pentru a stabili momentul apariției unei reacții tinctoriale caracteristice pentru elastină, am procedat astfel : începînd cu ziua a doua de incubație s-au fixat în Carnoy, zilnic la aceeași oră, un număr de embrioni. Seriile provenite din acești embrioni au fost colorate cu orceină (metoda Pranter). După o bună diferențiere, materialul fixat în Carnoy nu prezintă colorate decît elementele elastice (fixarea în formol favorizează, la aceeași colorație, persistența unei nuanțe brune difuze care îngreunează depistarea elementelor fine elastice).

Pînă la sfîrșitul zilei a treia de incubație, rezultatul este mereu același : decolorarea totală a întregului embrion. La începutul celei de a patra zile obținem prima reacție tinctorială pozitivă. Zona primei apariții a țesutului embrionar „elastic", adică capabil să fixeze orceina, se află înapoia trunchiului arterial al inimii, între acesta și tubul digestiv, respectiv mugurele pulmonar. În această regiune apare, pe secțiunile colorate cu orceină, o aglomerare densă de granule, care s-au colorat intens. Masa de granule ocupă o fîșie destul de bine circumscrisă de țesut mezenchimatos, care se întinde înapoia și de-alungul întregului trunchi arterial, de la originea arcurilor arteriale branhiale (pulmonare), pînă la capătul cranial al trunchiului pe care îl depășește încă în sus (fig. 341 și 342).

Denumim întreaga masă de țesut mezenchimatos care conține aceste elemente granulare, „tract elastic primitiv granular" și îi distingem : o parte *cranială*, a cărei extremitate depășește în sus trunchiul arterial, și o parte *caudală*, situată deocamdată la nivelul originii arcurilor pulmonare. Această porțiune caudală va intra în legătură cu viitorul sept aorto-pulmonar.

Vom descrie mai amănunțit topografia regiunii acestei prime apariții a țesutului elastic.

Capătul arterial al tubului cardiac — bulbul inimii — continuă printr-un conduct median „trunchiul arterial" turtit antero-posterior, care emite în dreapta și în stînga arcurile vasculare branhiale, și anume, în a patra zi de incubație, de sus în jos : arcul III, IV și VI—V (contopite). Aceste arcuri înconjură lateral tubul digestiv (faringele) și se varsă dorsal în rădăcinile aortei dorsale. Trunchiul arterial, cu arcurile pe care le emite, seamănă în acest stadiu întrucîtva cu un candelabru cu trei perechi de brațe suprapuse în același plan frontal.

Pe figura 342 vedem o secțiune transversală prin partea inferioară a tractului elastic. Celulele mezenchimatoase din jurul trunchiului arterial formează aici un strat mai dens, cu spații intercelulare mai înguste decît în restul mezenchimului. Zona de maximă densitate a granulelor vizibile pe microfotografie se află la periferia acestei zone dense, relativ departe de lumina trunchiului, deci nu în peretele acestuia.

La sfîrșitul celei de a patra zile de incubație ajungem la stadiul reconstruit în fig. 343. Printr-o secțiune sagitală prin model, partea dreaptă a inimii, bulbul și trunchiul arterial au fost îndepărtate. Arcurile arteriale din stînga sînt păstrate pînă la locul originii lor în trunchiul arterial, unde au fost secționate (vezi inscripțiile III, IV, VI) Arcurile. din dreapta sînt parțial rezecate. Tractul elastic primitiv este înfățișat în cenușiu-închis (adică regiunea mezenchimului în care se găsesc elementele tipic colorate). Capătul cranial al tractului (Tr. el. pr. a.), constituit dintr-o fîșie granulară alungită, ajunge pînă în dreptul tiroidei, în mugurele lingual. Capătul caudal al tractului (Tr. el. pr. b.) s-a îngroșat mult și a luat formă de cîrlig de undiță, intrînd cu capătul său în masa de țesut mezenchimatos care separă pîlnia arcurilor pulmonare de trunchiul arterial, viitorul sept aorto-pulmonar.

Tractul elastic primitiv are deci, în acest stadiu (sfîrșitul celei de a patra zile), forma unei virgule, cu capătul gros în septul aorto-pulmonar și coada (ventral concavă) așezată în fața tubului digestiv, respectiv a mugurelui pulmonar. Formațiunea întreagă apare compusă dintr-un praf de granule net colorabile, dese în capătul virgulei, din ce în ce mai rare către vîrful ei, care se prelungește, subțiindu-se, pînă în regiunea tiroidei, unde se pierde. Masa granulară e omogenă în partea ei inferioară, mai neomogenă — cu insule agranulare — în partea superioară.

În însuși peretele bulbului, respectiv al trunchiului arterial, au început să apară primele elemente elastice (tot granulare), pe care le vom numi parietale, spre deosebire de cele ale tractului, care sînt extraparietale.

Figura 345 arată situația tractului elastic primitiv din stadiul reconstituit plastic în fig. 343 și 344 în ansamblul secțiunii transversale prin corpul embrionului. Situația sa topografică este interesantă din mai multe puncte de vedere. Tractul este situat în singura punte de țesut consistentă care leagă inima de restul trunchiului embrionar. Pe secțiune, această legătură este constituită de inserțiile pericardului și mai cu seamă de partea mazenchimală amintită, relativ largă, care se întinde de la bulbul inimii pînă la aortă — un fel de mediastin embrionar. Această masă de mezenchim trebuie să reziste la tracțiunile ritmice produse de contracțiile musculaturii cardiace.

Secțiunea demonstrează și interpunerea tractului elastic între arcul IV din dreapta (viitoarea aortă) și arcul VI din stînga (viitoarea ramură stîngă a arterei pulmonare).

Legătura porțiunii caudale a tractului elastic primitiv cu septul aorto-pulmonar ne face să insistăm aici asupra procesului de septare și de rotație a bulbului septat, un

fenomen extrem de complicat în realitate și care face obiectul unui număr însemnat de cercetări.

Țesutul mezenchimatos din „pintenele" situat deasupra pîlniei de origine a arcurilor pulmonare este acum mai dens, spațiile intercelulare se restrîng, celulele sînt mai puțin stelate, mitozele mai frecvente.

Această masă de celule proliferează înaintînd și subîmparte astfel cavitatea trunchiului arterial și a bulbului într-un compartiment superior și unul inferior. Cel superior rămîne în legătură cu arcurile III și IV din stînga și dreapta, cel inferior cu ambele arcuri pulmonare. Pintenele septal crește în direcție cranio- caudală și postero-anterioară. În același timp are loc o torsiune a întregului conduct sanguin bulbo-truncal, care are ca rezultat rotația compartimentului inferior (în legătură cu arcurile pulmonare) înspre stînga și a celui superior înspre dreapta. Din bulb, sîngele are acum două căi de ieșire : prima duce în arcurile III și IV din dreapta și III din stînga (arcul IV din stînga se obliterează). Această cale devine aorta cu ramurile sale mari. A doua duce în arcurile pulmonare. Calea aceasta devine artera pulmonară. Arcul IV din stînga se subțiază și se obliterează. Soarta lui ulterioară este pentru noi interesantă și vom reveni asupra ei.

Înălțimea trunchiului septat scade acum mult. Arcurile III și IV nu mai rămîn în același plan frontal, ci arcul III se plasează înapoia arcului IV.

Modificările suferite de căile sanguine n-au avut loc fără modificări corespunzătoare ale tractului elastic primitiv. Curbura capătului său inferior se accentuează și ia forma unui cîrlig „de undiță" care „încarcă" arcurile III și IV în stînga, separîndu-le de arcul pulmonar.

Figura 346 ne înfățișează pintenul septal din ziua a cincea. În teritoriul fostului trunchi arterial — acum complet septat (S) — se văd cele două conducte P și A (aorta și pulmonara). În locul însemnat cu săgeata se vede îngrămădirea granuloasă, densă, a tractului elastic — mijlocul masei celulare septale — al cărei aspect deosebit contrastează cu cel al mezenchimului obișnuit. Atmosfera mezenchimatoasă a tractului granular este caracterizată prin așezarea densă, „tixită", a celulelor, care nu mai lasă spații între ele. Celulele care constituie pereții laterali ai aortei și pulmonarei nu prezintă încă o așezare tipică. Spre deosebire de fig. 342, tractul elastic apare în acest stadiu turtit lateral. În partea lui anterioară au apărut fine fibrile colorate, dînd acestei părți a tractului un aspect granulo-filamentos.

Înainte de a continua cu descrierea soartei elementelor elastice apărute trebuie să insistăm asupra „granulelor colorate". Ele nu sînt formațiuni izolate plutind libere, în interstițiile țesutului mezenchimatos (fig. 347). Chiar așezarea lor în lanțuri, care seamănă cu streptococii (fig. 348), sugerează ideea unei legături între ele. Într-adevăr, prin microdilacerări am putut obține imaginea convingătoare (fig. 346). Este clar că granulele noastre se află înăuntru și pe traiectul unei fibrile extrem de fine, necolorate. Intervenția a putut izola aceste fibrile de celulele înconjurătoare. Granulele se arată a fi astfel porțiuni diferențiate, deosebit înzestrate din punct de vedere fizico-chimic, în sînul unei fibrile încă „nediferențiate".

În ziua a cincea apare țesutul elastic, colorabil și în pereții aortei și arterei pulmonare, diferențiere legată de pulsațiile acestor vase, ai căror pereți s-au consolidat. Este vorba de răzlețe șiruri de granule și fine fibrile care apar în circumferințele laterale ale ambelor conducte (mai intens în pulmonară care deservește încă marea circulație).

Fibrilele sînt așezate uneori în două planuri net separate, avînd direcții perpendiculare (una longitudinală față de axul vasului, cealaltă perpendiculară pe prima).

În acest stadiu de dezvoltare putem găsi deci două așezări distincte de elemente elastice :

a) țesutul elastic extraparietal (masa granulo-filamentoasă a „tractului");

b) țesutul elastic parietal.

Septul aorto-pulmonar înaintează acum în bulb, împărțindu-l complet. Septul se infiltrează în pernițele endoteliale ale bulbului, care, prin proeminența lor în lumina bulbară, constituie un aparat valvular primitiv.

La 7 zile (fig. 349), subîmpărțirea bulbului este deocamdată numai internă. Cele două tuburi (aorta și pulmonara) nu au încă pereți proprii pe întreaga lor circumferință. Septul le formează un perete comun : tractul elastic granular apare înăuntrul septului situat astfel între cele două conducte sanguine (fig. 350). În tract, elementele colorate păstrează aspectul lor granulo-filamentos, spre deosebire de țesutul elastic parietal al aortei și pulmonarei, care a devenit fibrilar. Acest țesut elastic parietal apare în pereții laterali ai ambelor tuburi în partea depărtată de peretele comun septal, acolo unde expansiunile ritmice sînt maxime (fig. 354).

Elementele elastice ale pereților aortei și pulmonarei se orînduiesc acum în trei straturi distincte : 1) un strat pur granular la periferie ; 2) un strat mijlociu, format din fibrile cu așezare transversală (perpendicular pe axa vasului) ; 3) fascicule de fibre longitudinale, în apropierea endoteliului.

Această așezare a elementelor elastice în vasele embrionare diferă foarte mult, la această epocă de dezvoltare, de tipul adult. În locul membranelor elastice găsim aici — la prima apariție — fascicule individualizate și orientate perpendicular între ele. Fibrele elastice din stratul transversal, după ce au înconjurat circumferințele laterale ale aortei, respectiv ale pulmonarei, converg în sept spre tractul elastic septal. Văzut în întregime stratul transversal formează un dispozitiv în 8 cu intersecția în tractul elastic septal.

Din acest moment începe regresiunea treptată a tractului elastic extraparietal.

În unele locuri avem impresia că materialul tractului este înglobat în pereții vasculari. Masele granulare răzlețe se mai găsesc un timp întreg între aortă și artera pulmonară, ca și în mediastin. Regresiunea tractului coincide cu consolidarea pereților vaselor mari, care constituie acum mijlocul principal de transmitere a tracțiunilor cardiace.

Am amintit mai sus de obliterarea arcului IV stîng. Interesant este însă că el persistă — după obliterare — sub forma unui ligament elastic, reperabil, încă în a 8-a și a 11-a zi de incubație. Această formațiune pornește din baza aortei unde se mai găsește uneori un vestigiu al luminii vasului obliterat. De acolo cordonul elastic se îndreaptă spre stînga, aflîndu-se între ramura stîngă a pulmonarei și carotida primitivă stîngă, se subțiază din ce în ce mai mult și se „termină" din punct de vedere tinctorial în țesutul conjunctiv lax (fig. 351).

Din punctul de vedere al genezei țesutului elastic ne interesează aici o orientare longitudinală și paralelă a fibrelor elastice din acest cordon, probabil solicitat mecanic prin tracțiuni ritmice.

Reconstrucția din fig. 352 și 353 reprezintă situația din ziua a șasea de incubație. Aici inima și vasele mari se apropie de forma lor definită.

Din cercetările noastre morfologice reiese deci că, între ziua a treia și a șasea de incubație, se dezvoltă la embrionul de găină o formațiune „trecătoare" (organ trecător), compusă din granulo-filamente cu reacție tinctorială, caracteristică țesutului elastic, formațiune intrînd în constituția septului aorto-pulmonar ; ea capătă legături cu fibrile parietale ale aortei și arterei pulmonare și dispare către a șaptea zi.

Formațiunea elastică descrisă este un fel de organ embrionar trecător, precursorul țesutului elastic al vaselor mari.

Nucleul primitiv elastic apare în corpul embrionar în unica regiune — existentă la această dată a ontogenezei — care suportă solicitările mecanice ritmice.

Pe măsură ce se consolidează pereții aortei și arterei pulmonare, solicitările mecanice care rezultă din contracțiile inimii se transmit din ce în ce mai mult prin aceste formațiuni asupra organelor învecinate mediastinale. În consecință, se dezvoltă țesutul elastic în pereții vaselor mari, iar tractul elastic primitiv — organ trecător — dispare.

Diferențierea țesutului elastic în corpul embrionului apare deci ca un răspuns adecvat determinat de solicitarea mecanică a mezenchimului. Elastina apare întîi sub forma unor porțiuni delimitate (granulele) înăuntrul unei fibrile preexistente, încă nediferențiate în direcția ultrastructurii elastice. Apoi, prin înmulțirea granulelor de-a lungul fibrilei, are loc transformarea ei totală într-un element elastic.

Este interesant că și fibrele elastice adulte tratate în mod corespunzător prezintă o striație transversală (fig. 355).

Condițiile necesare diferențierii țesutului elastic la embrion constituie un obiect de studiu al colectivului nostru. Sînt în curs cercetări în care găsesc o largă folosire metodele biochimice, și biofizice, transplantările și explantările.

BIBLIOGRAFIE

1. Bloom W., *The Development of Elastic Fibres in Cultures of Embryonic Heart and Aorta*, Arch. Exper. Zellforsch; 1929, vol, 1, p. 6.
2. — *Development of Elastic Fibres in Cultures of Embryonic Heart Muscle*, Proc. Soc. Exper. Biol., 1929 vol. 26.
3. Born, *Beiträge zur Entwicklungsgeschichte des Säugetierherzens*, Arch. f. mikr. Anat., 1889, vol. 33.
4. Congdon F. D. et Wang H. W., *The Mechanical Processes concerned in the Formation of the Differing Types of Aortic Arches of the Chick and the Pig and in the Divergent Early Development of their Pulmonary Arches*, Am. J. of Anat, 1926, vol. 37, nr. 3.
5. Fürsting, *Mitteilung über die Entwicklung der primitiven Aorten nach Untersuchungen an einem Hahn*, Inaug. Diss., Dorpat, 1886.
6. Gardner, *Zur Frage über die Histogenese des elastischen Gewebes*, Biol. Zentralblatt, 1897, vol. 17, p. 394.
7. Gräper L., *Wachstumsvorgänge, beobachtet mittels Stereo-Komparation von Reihenaufnahmen lebender Hühner-Embryonen*, Zschr. f. Anat. u. Entw. Gesch., vol. 92.
8 — *Zur Entwicklung der elastischer Elemente der Arterienwand*, u. Anat., 1928, vol. 85, p. 704.
9. Harting Kurt, *Elastische Strukturen in der Wand von Hohlorganen*, Ztsch. f. Anat. u. Entw. Gesch., vol. 103, p. 395.
10. Kastschenko, *Das Schlundspaltengebiet des Hühnchens*, Arch. f. Anat. u. Physiol., 1887.
11. Kerwily M. de, *Les fibrilles élastiques dans les lames collagènes*. Soc. Biol., 1924, t. 90, p. 851.
12. — *Les granulations des élastoblastes et les premier stades de développement des fibres élastiques, révélé, par l'imprégnation d'argent*, C. R. Soc. biol., 1924, t. 90, p. 1022.
13. Krompecher St., *Die Entwicklung der elastistischen Fasern des Bindegewebes*, Verch. Anat. Gesellsch. Amsterdam, 1931, vol. 39, p. 49.
14. Langer A., *Zur Entwicklungsgeschichte des Bulbus cordis bei Vögeln u. Säugetieren*, Morphol. Jahrb., 1859 v. XXII.
15. Ludwig F. W., *Beobachtungen am explantierten Bindegewebe mit besonderer Berücksichtigung der Fibrillenbildung*, An. Ber., 1930–1931, t. XX, p. 401.
16. Mall F. P., *Entwicklung der Branchialbugen des Hännchens*, Arch. f. Anat. u. Physiol., 1887.
17. Masins, *Quelques notes sur le développement du cœur chez le poulet*, Arch. d. Biologie, 1889, t. IX.
18. Maximov A., *Development of Argyrophile and Collagenous Fibres in Tissue Cultures*, Proc. Soc. Exper. Biol., 1928, vol. 25, p. 439.

19. *Maximov A., Development of Argyrophile and Collagenous Fibres in Tissue Cultures,* Proc. Soc. Exper. Biol., 1928. vol. 256, p. 439—442.

20. Nakai Motokichi, *Entwicklung der elastischen Fasern,* Virschows Arch., 1905, vol. 182.

21. Nauck C. Th., *Dielfunktionelien Bezihungen zwischen kollagenen Tibritten und elastiehen Fasern,* Gegenhauers, Morphol. Jahrb., 1931, vol, 70, p. 16.

22. Pernkopff u. Wirtinger, *Die Phononomie der Herzentwicklung,* Ztsch. f. Anat. u. Entwickl. Gesch., vol 100, p. 563.

23. Rainer Fr. J. et Menkes B., *Contributions à l'étude de la structure de la fibre élastique,* în *L'œuvre scientifique de Fr. J. Rainer,* Academia Romînă, vol. III, 1945, p. 67.

24. — *Etudes sur la génèse du tissu élastique,* în *L'œuvre scientifique de Fr. J. Rainer,* Academia Romînă vol. III, 1945, p. 41.

25. Riedel G., *Die Entwicklung der Entartung des elastischen Gewebes in der senilen Mamma,* Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol., 1925, vol. 256, p. 243.

26. Rothig P., *Entwicklung der elastischen Fasern,* Erg. An., vol. XVII.

27. Scelkunow S., *Beiträge zur Frage des Baues der Bulgefässe unter normalem und experimentellen Bedingungen. I. Eastisches Stroma der Kleinkalibrigen Organe,* Ztsch. f. Anat. u. Entwickl. Gesch., vol. 103, p. 30.

28. Schwalbe G., *Über Wachstums-Verschiebungen und ihr Einfluss auf die Gestaltung des Arteriensystems,* Jenaische Ztsch. f. Naturw., 1878, vol. XII.

29. Thoma R., *Untersuchungen über die Histogenese und Histmechanik des Gefässystems,* Stuttgart, 1893.

30. Vialleton L., *Developpement des aortes postérieures de l'embryon de poulet,* C. R. Soc. biol., Paris, 1891, t. III, p. 9.

31. Volmar Hidegard, *Eine Methode zur Beobachtung der Entwicklung des Hühnerembryons in vitro,* Ztschr, f. Zellf. u. mikr. Anat., 1935, vol, 33, nr. 3, p. 50.

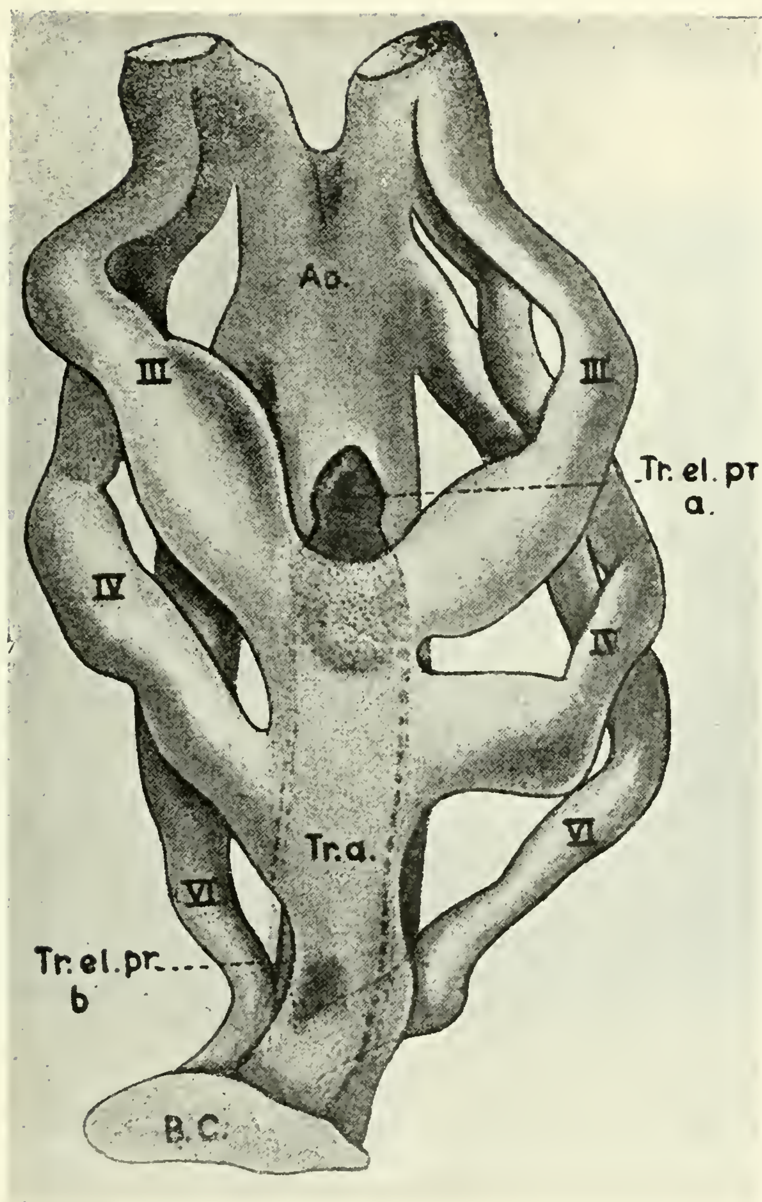


Fig. 341. — Embrion de găină. Începutul celei de a patra zile de incubație. Trunchiul arterial („aorta ventrală"), cu arcurile arteriale branchiale III, IV și VI. Reconstrucție plastică.

B.C. — *Bulbus cordis*; *A O.* — Aorta dorsală. *Tr. a* — Trunchiul arterial. *Tr. el. pr. b* — Extremitatea inferioară a tractului elastic primitiv. *Tr. el. pr. a.* — Extremitatea superioară a tractului elastic primitiv.

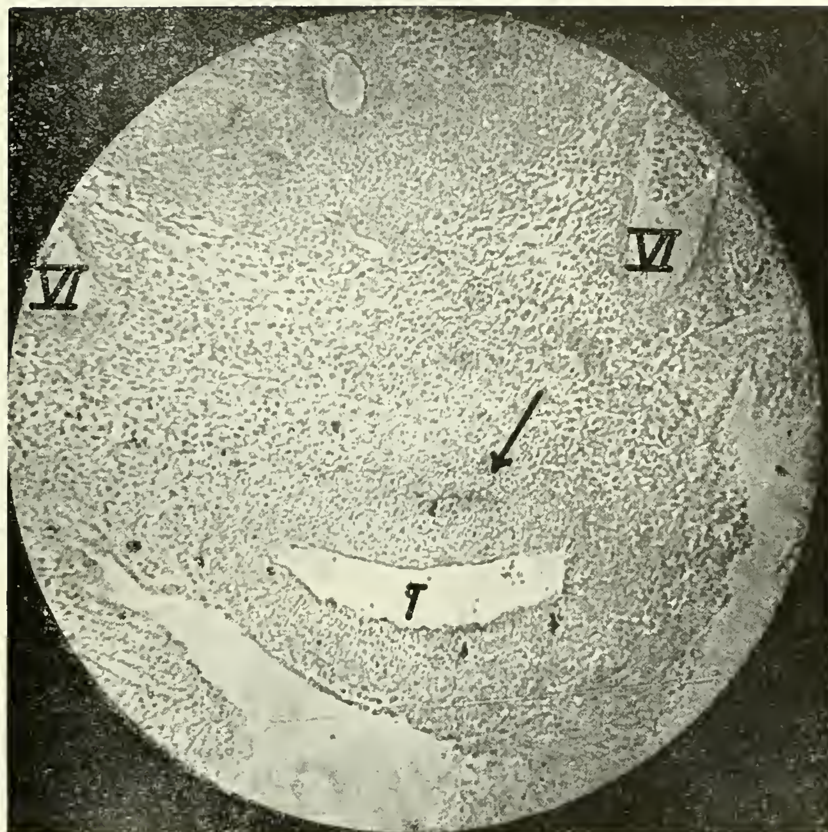


Fig. 342. — Embrion de găină. Începutul celei de a patra zile de incubaţie.
Secţiune prin trunchiul arterial (*T*); tractul elastic primitiv (↙). *VI* — Arc arterial VI. Secţiunea corespunde nivelului extremităţii inferioare a tractului elastic primitiv din fig. 341.

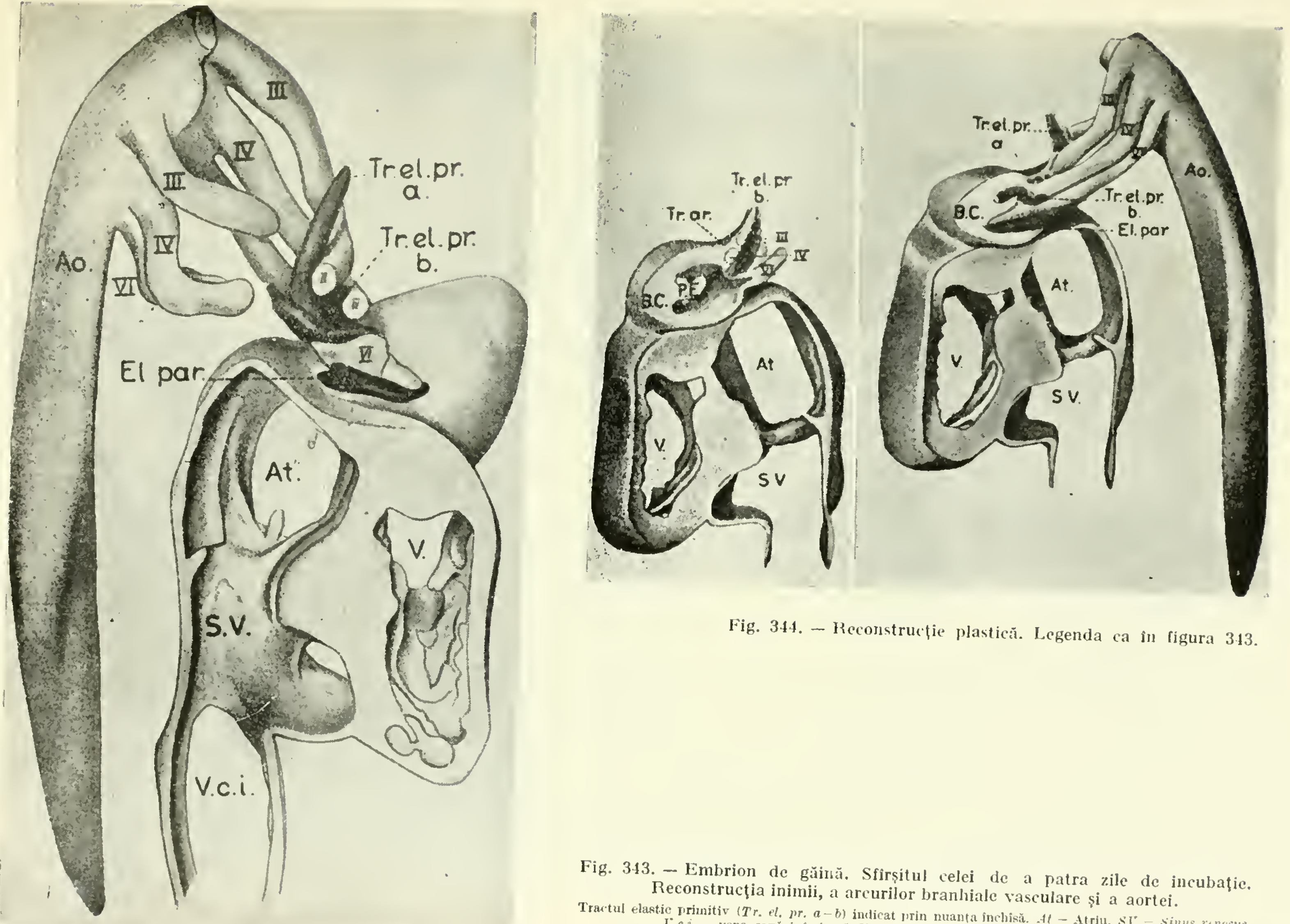


Fig. 344. — Reconstrucție plastică. Legenda ca în figura 343.

Fig. 343. — Embrion de găină. Sfîrșitul celei de a patra zile de incubație. Reconstrucția inimii, a arcurilor branhiale vasculare și a aortei.
Tractul elastic primitiv (*Tr. el. pr. a–b*) indicat prin nuanța închisă. *At* – Atriu. *SV* – *Sinus venosus*. *V.c.i.* – vena cavă inferioară. *V* – ventricul. *El. par.* – Țesut elastic parietal. *PE* – perniță endocardică. *B.C.* – *Bulbus cordis*.

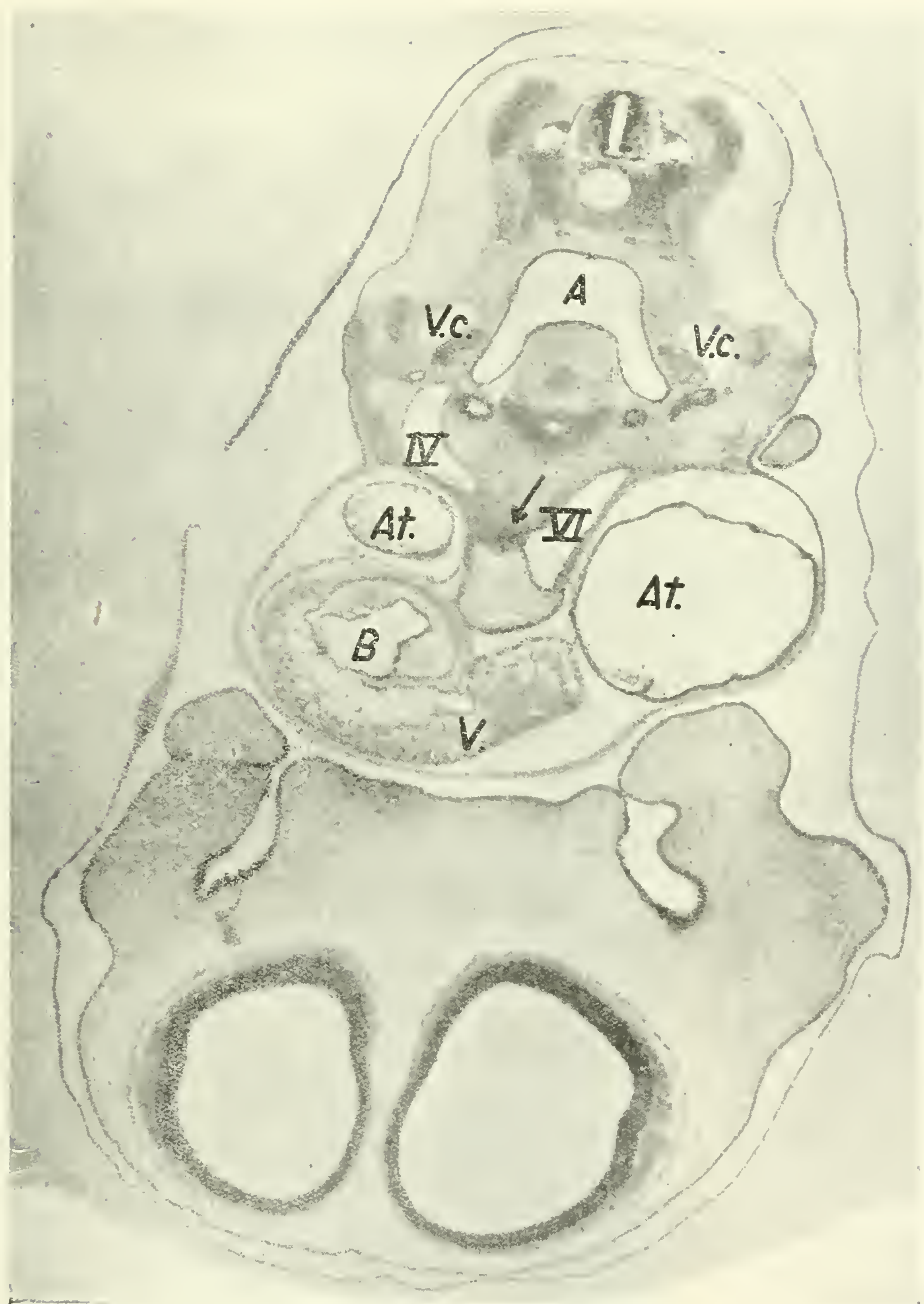


Fig. 345. — Secțiune transversală printr-un embrion de găină pe la sfîrșitul celei de a patra zile de incubație.

A — Aorta dorsală. *V.C.* — Vene cardinale. *At.* — Atriu. *B* — *Bulbus cordis*. *V* — Ventricul — regiunea tractului elastic primitiv în „mediastinul" embrionar indicată de săgeată.

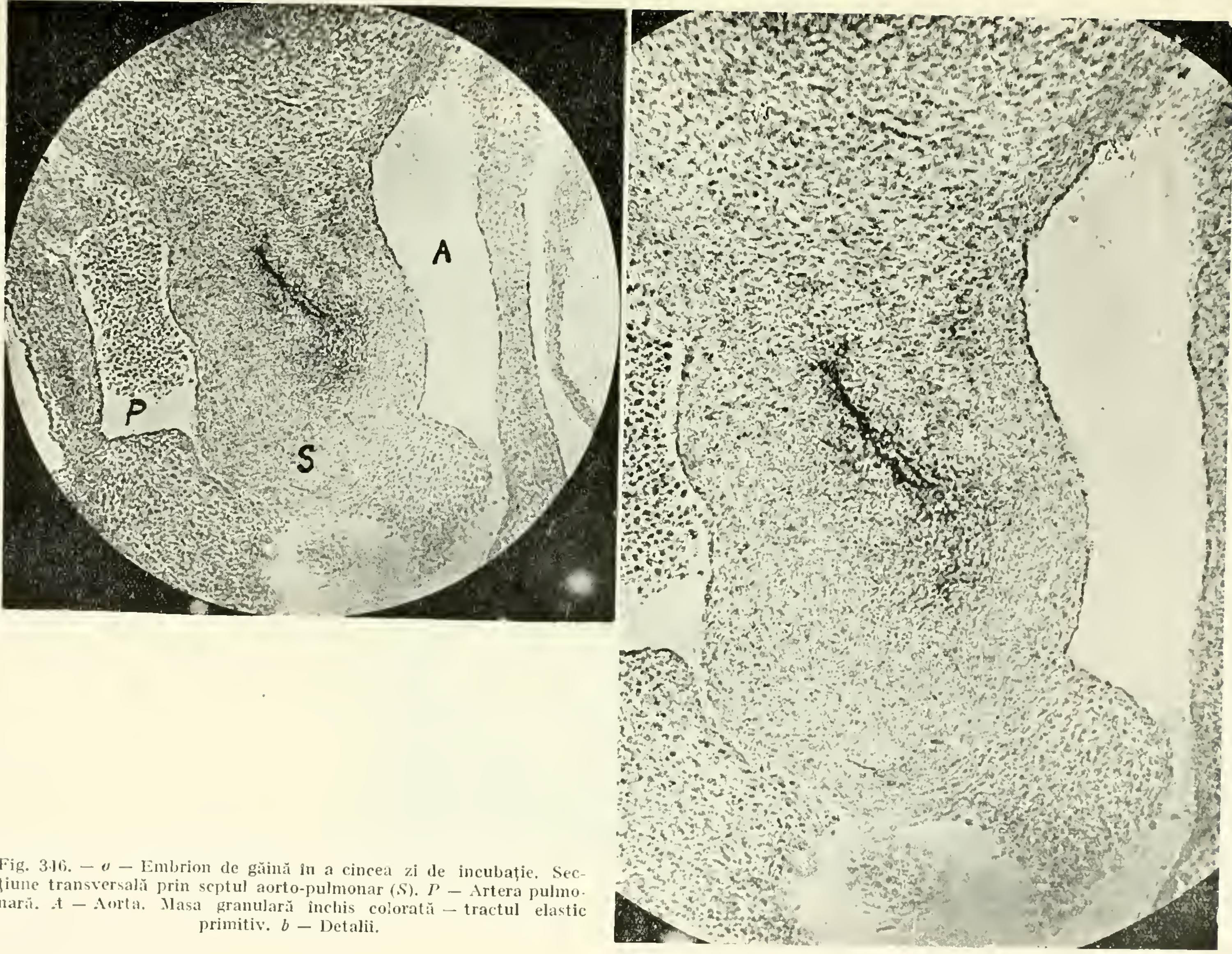


Fig. 346. — *a* — Embrion de găină în a cincea zi de incubație. Secțiune transversală prin septul aorto-pulmonar (*S*). *P* — Artera pulmonară. *A* — Aorta. Masa granulară închis colorată — tractul elastic primitiv. *b* — Detalii.

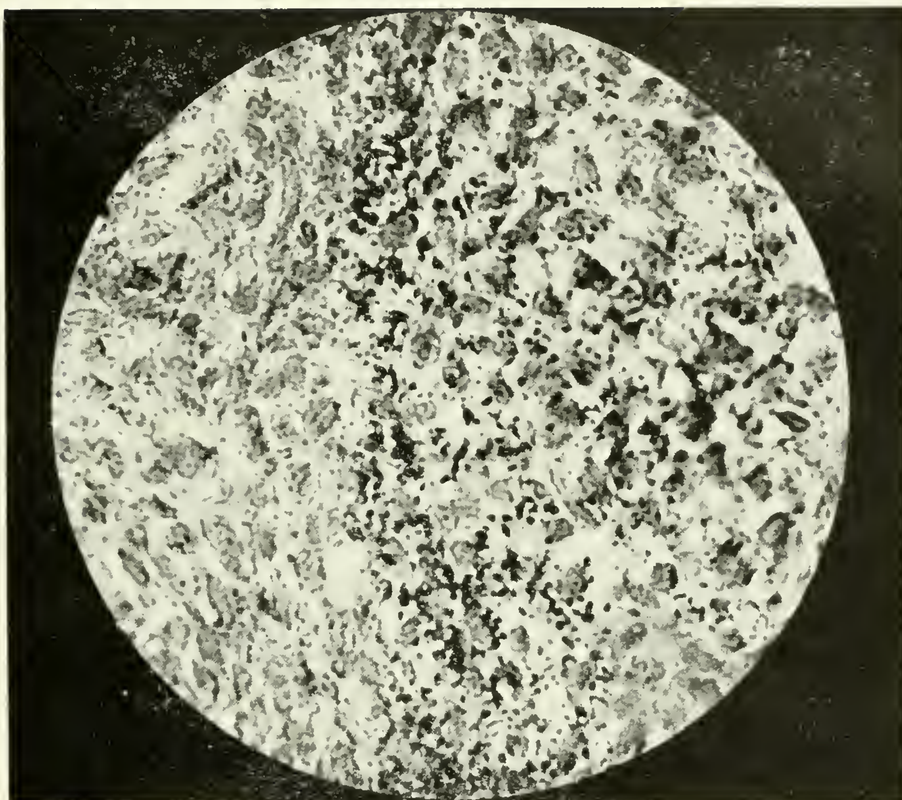


Fig. 347. — Granulele „elastice" din tractul elastic primitiv.

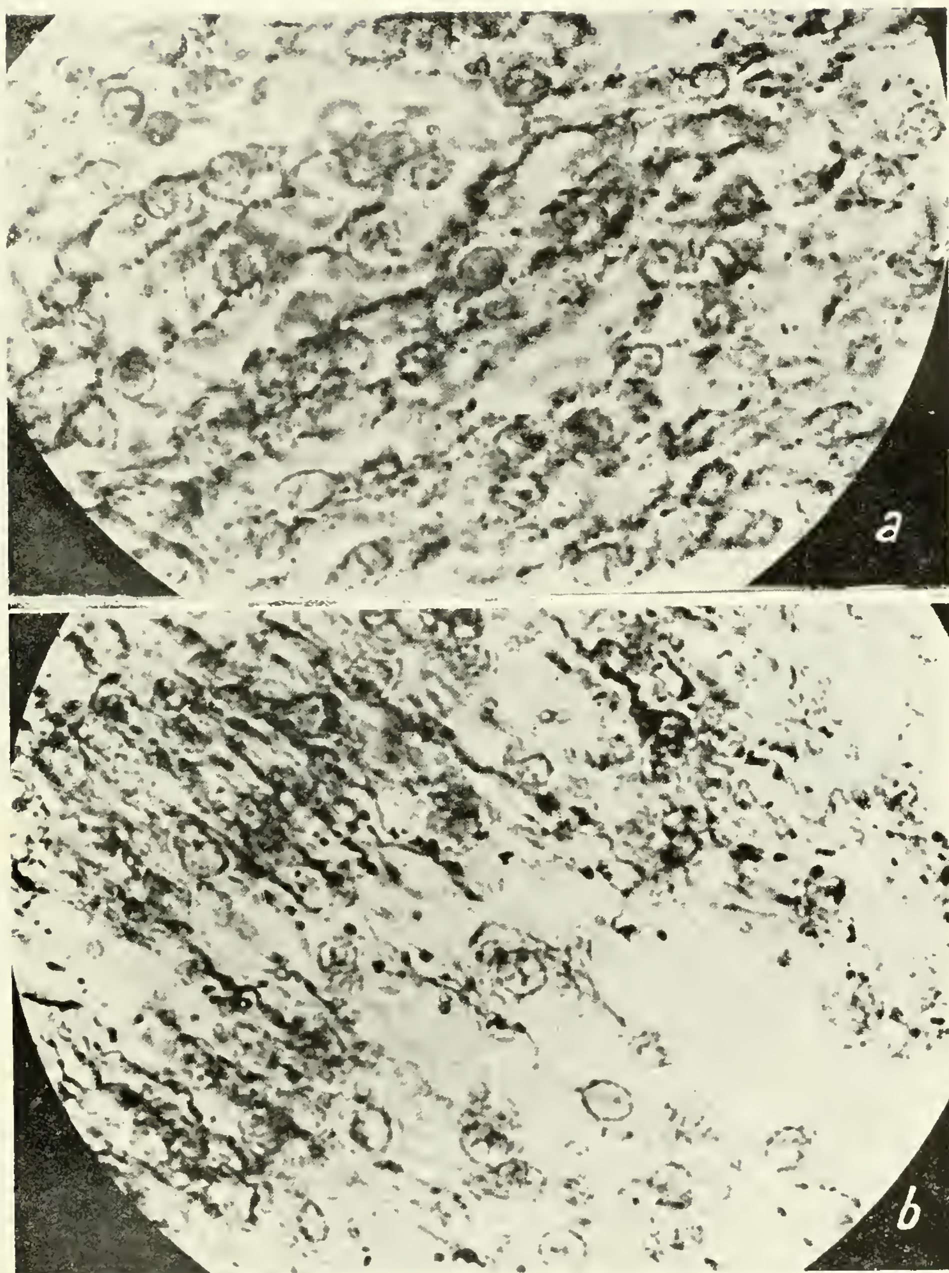


Fig. 348. — Embrion de găină de 5 zile de incubaţie. *a* — Tractul elastic primitiv. Aşezarea granulelor „elastice" în şiruri cu aspectul celor de streptococi. *b* — Evidenţierea fibrilei necolorate în sînul căruia se diferenţiază granulele.

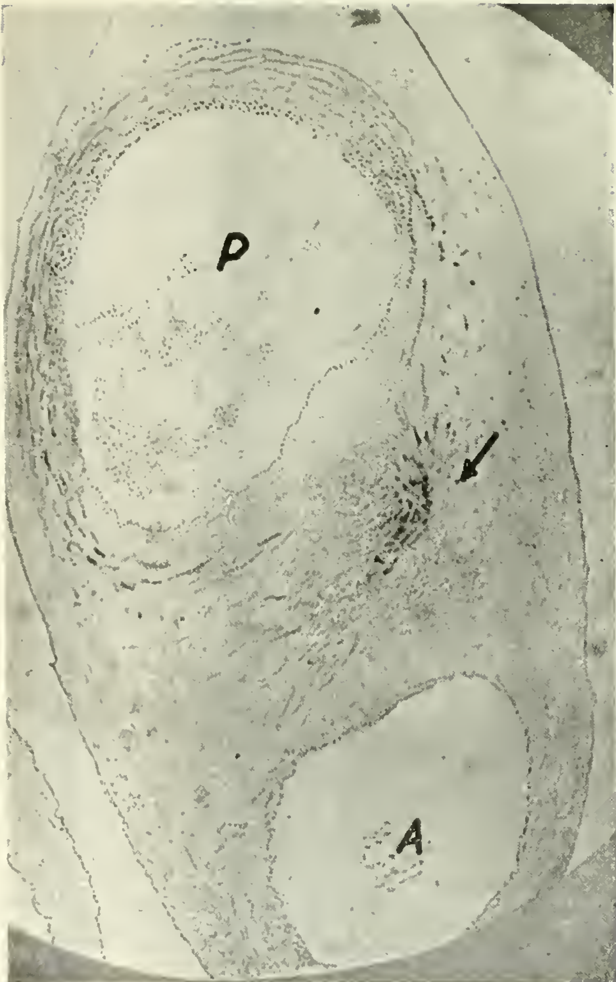


Fig. 349. — Embrion de 7 zile de incubaţie. Secţiune transversală prin bulbul inimii.

A – Aorta. *P* – Artera pulmonară; (↙) tractul elastic granulo-filamentos septal. Apariţia fibrelor elastice parietale.

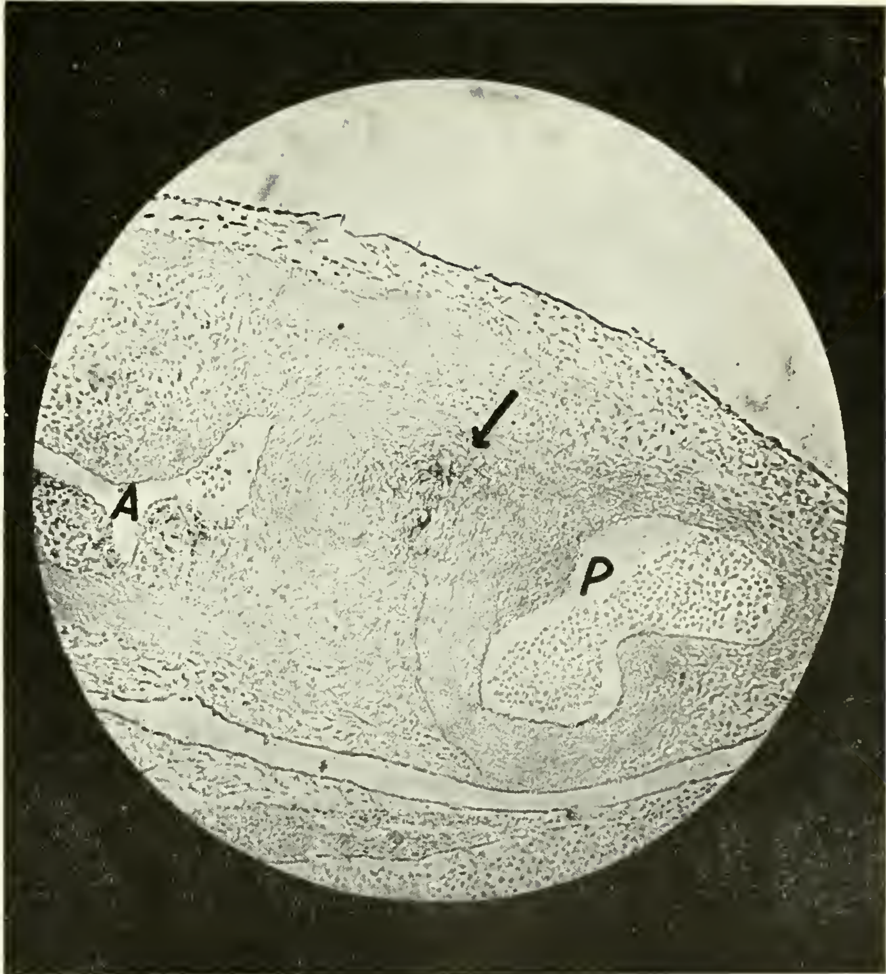


Fig. 350. — Secţiune prin bulbul inimii din figura 349. Nivel mai distal.

(↙) – Tractul elastic. *A* – Aorta. *P* – Artera pulmonară.

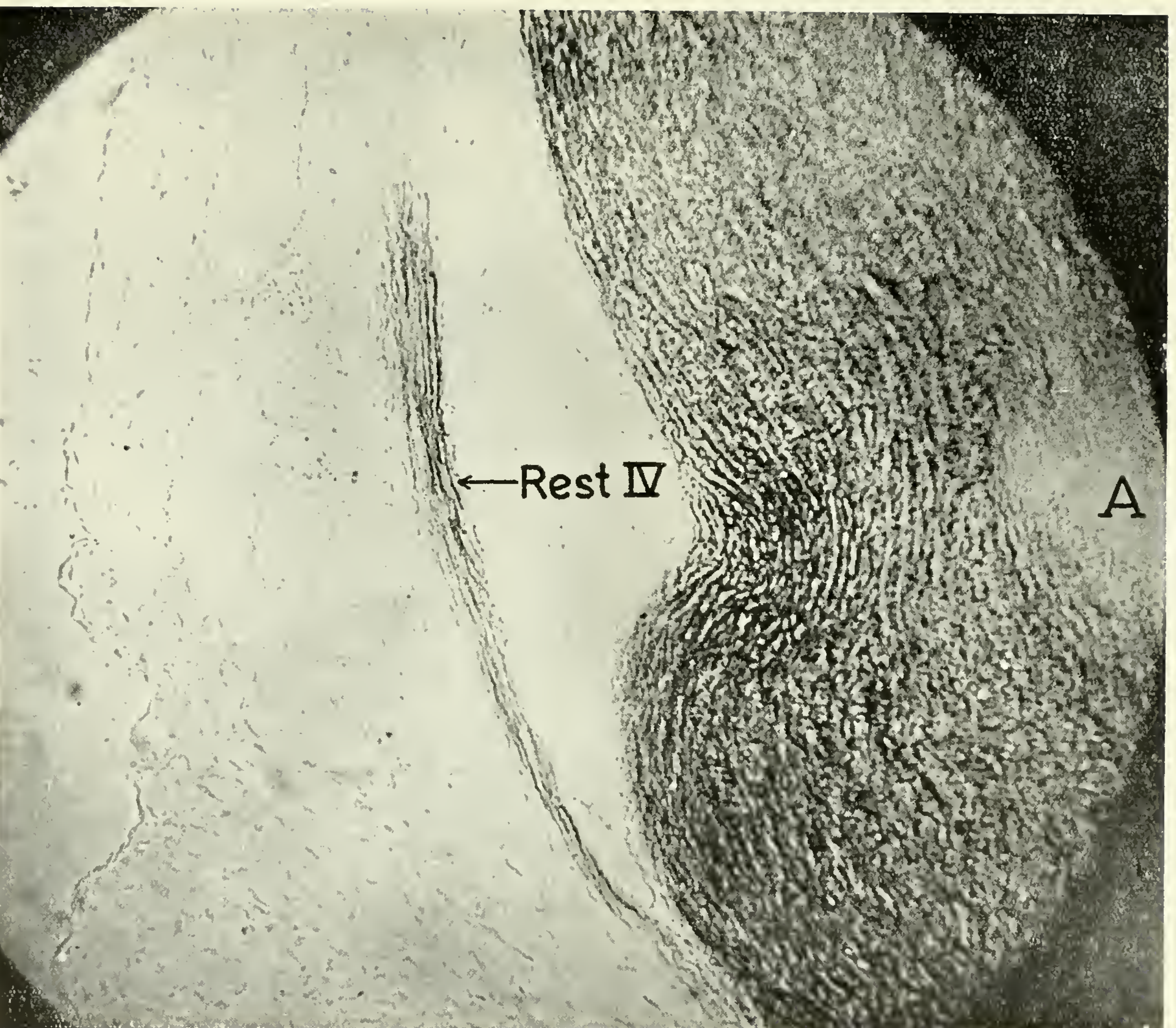


Fig. 351. — Embrion de găină de 11 zile de incubație.
Rudimentul (*rest IV*) elastic al arcului vascular IV stîng (transformat în ligament elastic); *A* — aorta.

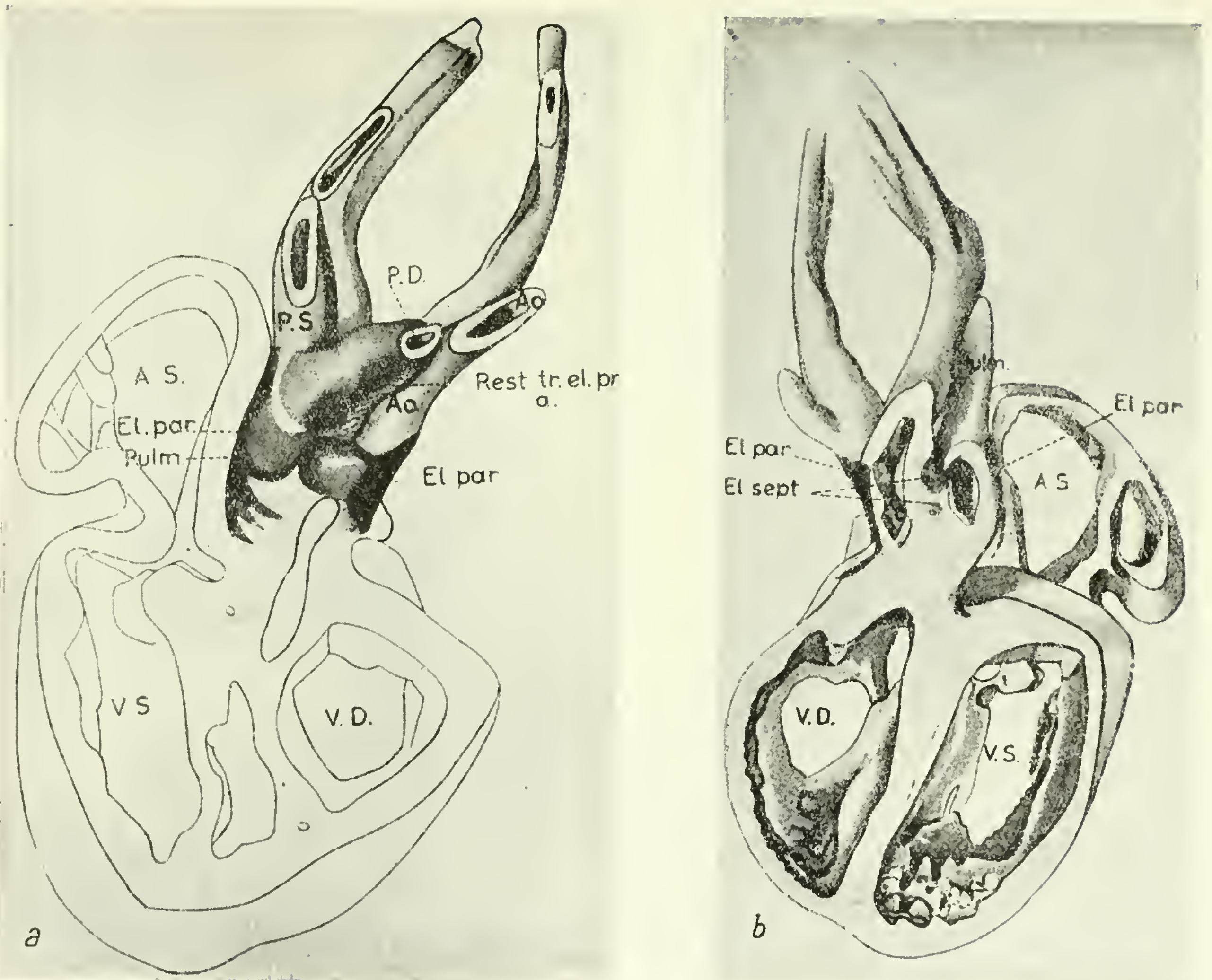


Fig. 352. — *a* și *b* — Embrion de găină din a șasea zi de incubație. Reconstrucția inimii și a vaselor mari.
A.S. = atriu sting; *V.S.* ventriculul sting; *V.D.* = ventricul drept; *P. d.* = pulmonara dreaptă; *P.S.* = pulmonara stingă; *AO.* = aorta; *E. par.* = țesut elastic parietal; *Rest tr. el. pr.* = restul tractului elastic primitiv; *El. sept.* — Țesut elastic septal.

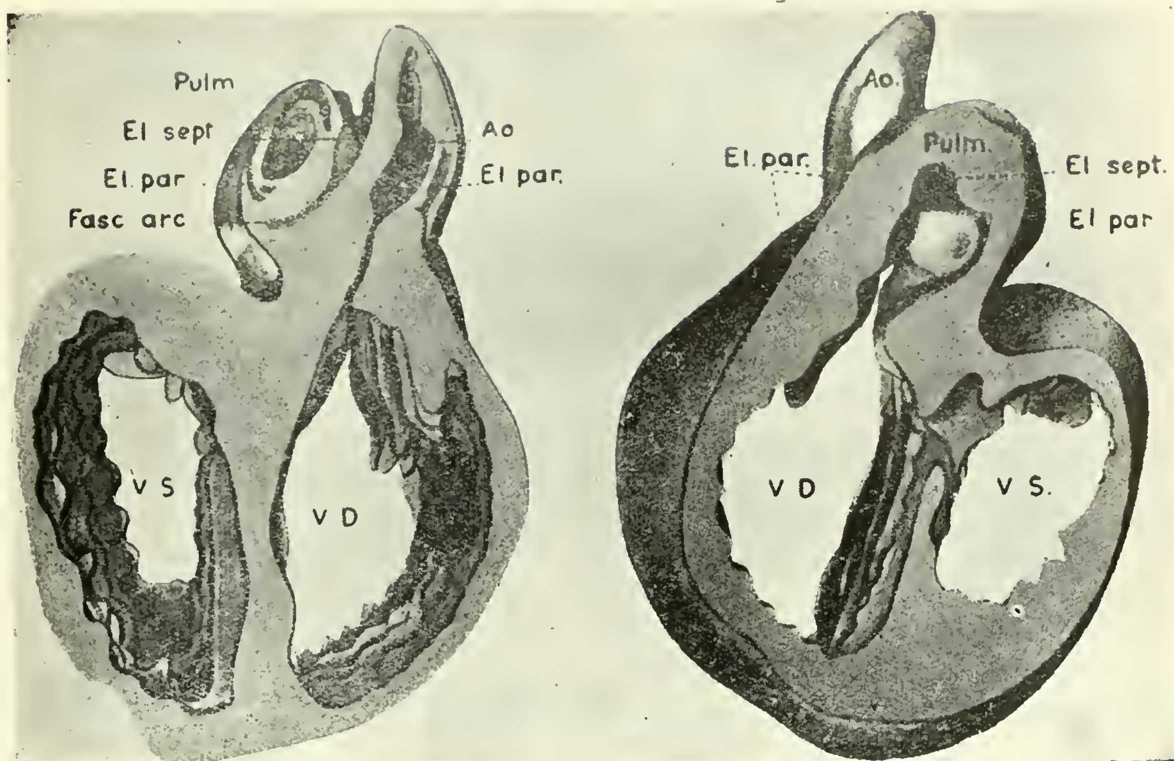


Fig. 353. — Porţiune din reconstrucţia fig. 352. (Aceeaşi legendă ca la fig. 352).

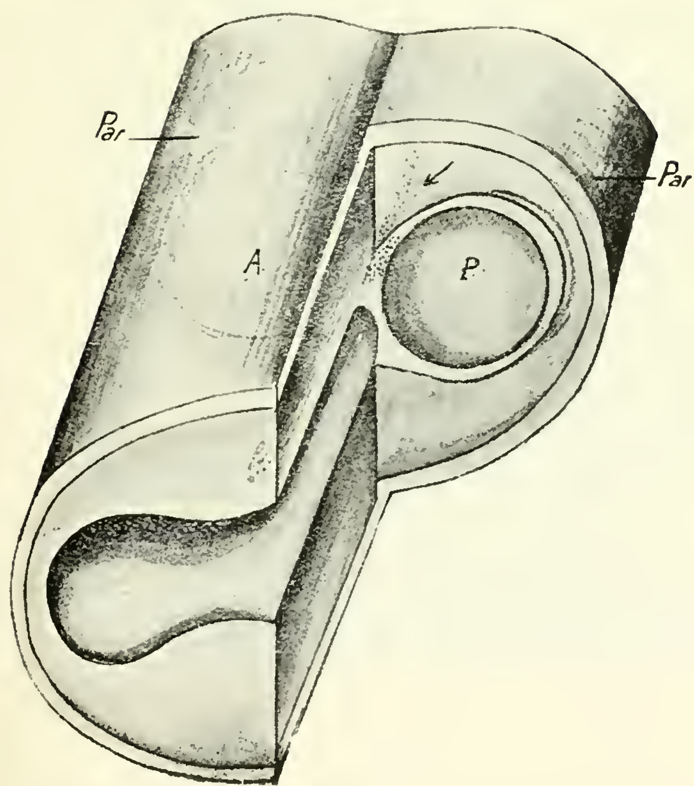


Fig. 354. — Schema trunchiului arterial parţial septat. Aşezarea elementelor elastice parietale (*par*) faţă de tractul elastic septal (↓).



Fig. 355. — Fibre elastice (om adult) ; evidenţierea discontinuităţilor.

PARTEA A V-A

CERCETĂRI ASUPRA UNOR INTERRELAȚII ALE COMPONENȚILOR COMPLEXULUI EMBRIONAR

CONȚINUTUL

Despre interrelațiile dintre corpul embrionului, lichidul subembrionar, sacul vitelin, alantoida și amniosul.

1. Stadializarea ontogenezei preeclozionale a embrionului de găină, după Ș m i d t și R a g o z i n a; cercetările lui R a g o z i n a asupra interrelațiilor din sînul complexului embrionar în legătură cu modul de nutriție și respirație a embrionului de găină în diferitele perioade ale dezvoltării sale.

2. Cercetări asupra interrelațiilor dintre corpul embrionului și sacul vitelin. Peretele sacului vitelin ca organ hematopoetic. Vascularizarea sacului vitelin. Efectul iradierii cu raze ultraviolete a ariei vasculare. Dezvoltarea ariei vasculare fără circulație.

3. Cercetări asupra circulației alantoidiene.

4. Cercetări asupra lichidului subembrionar.

Despre formarea lichidului subembrionar. Cercetări asupra compoziției lichidului subembrionar. Cercetări experimentale asupra efectului injecției de lichid subembrionar suplimentar în vezicula alantoidiană.

STADIALIZAREA ONTOGENEZEI PREECLOZIONALE A EMBRIONULUI DE GĂINĂ DUPĂ G. A. ŞMIDT ŞI M. N. RAGOZINA; CERCETĂRILE LUI M. N. RAGOZINA ASUPRA INTERRELAŢIILOR DIN SÎNUL COMPLEXULUI EMBRIONAR ÎN LEGĂTURĂ CU MODUL DE NUTRIŢIE ŞI RESPIRAŢIE A EMBRIONULUI DE GĂINĂ ÎN DIFERITELE PERIOADE ALE DEZVOLTĂRII SALE

O deosebită importanță pentru înțelegerea interacțiunilor ce se dezvoltă între corpul embrionului, pe de o parte, și albușul, sacul vitelin, amniosul, alantoida și coaja calcară, pe de altă parte, o au lucrările lui G. A. Ş m i d t și M. N. R a g o z i n a (1954 — 1955), care le-au permis să delimiteze, în dezvoltarea preeclozională a păsărilor, patru perioade principale, fiecare deosebindu-se de cea precedentă prin dezvoltarea unor interrelații noi între constituenții principali ai complexului embrionar.

Cunoașterea acestor interrelații și a condițiilor necesare apariției și dezvoltării lor este importantă pentru înțelegerea ontogenezei embrionare și indispensabilă în căutarea metodelor de dirijare a ontogenezei. Avicultura și îndeosebi practica clocirii artificiale beneficiază în largă măsură de rezultatele acestor cercetări.

Ş m i d t și R a g o z i n a disting pentru embrionul de pasăre următoarele perioade ontogenetice preeclozionale : perioada embrionară, prefetală, fetală și perioada de ecloziune.

R a g o z i n a consideră, pe drept cuvînt, gălbenușul, albușul și coaja oului —,,parte componentă a oului'' — mediul cel mai apropiat al embrionului, exprimînd astfel necesitatea de a înțelege embrionul cu substanțele embriotrofice și cu anexele sale extraembrionare ca un tot întreg, ceea ce noi denumim prin termenul de ,,complex embrionar''.

Noi nu putem pricepe dezvoltarea embrionului fără a considera unitatea embrionului cu mediul său apropiat și îndepărtat.

Începînd cu zigotul (sau eventual ovula nefecundată capabilă de dezvoltare), toți constituienții corpului embrionar, aparținînd tuturor etajelor structurale, organele extraembrionare, substanțele embriotrofice apropiate sau îndepărtate, organismele parentale —îndeosebi cel matern, în timp ce embrionul este în legătură cu acesta — și, în sfîrșit, factorii mediului extern, formează un sistem de interacțiuni din care rezultă însuși procesul de dezvoltare a embrionului. Noi numim întregul sistem de interacțiuni *complex ontogenetic*, (embrionar). Acest complex cuprinde deci într-o unitate constituenții embrionului, împreună cu toți factorii de mediu apropiați și îndepărtați, cu care se dezvoltă raporturi de interacțiune, (uneori caracterul de interacțiune nu este clar, din cauza participării inegale a componenților din sistemul interacțional).

Vom reda acum pe scurt caracterizarea celor patru stadii delimitate de Ș m i d t și R a g o z i n a în legătură cu modul de nutriție și de respirație al embrionului.

Perioada embrionară durează, la embrionul de găină, 7 zile. În această perioadă, albușul se condensează, cedînd apa sa spațiului subembrionar din sacul vitelin. Endodermul vitelin fagocitează și digeră globulele viteline (G u r v i c i, 1909, U s o v, 1915, R e m o t t i, 1929). *Faza digestiei intracelulare* a endodermului vitelin se combină cu *faza digestiei extracelulare* prin difuziunea fermenților secretați de endodermul vitelin înspre lichidul subembrionar (R e m o t t i — C o n o p a ț k a, 1933).

Substanțele care rezultă din ambele moduri de digestie ajung la embrion prin difuziune și prin circulația vitelină. Respirația embrionului se face întîi prin difuziune, iar apoi cu ajutorul absorbției oxigenului de către eritrocitele circulației viteline. Din a cincea zi încep să se dezvolte insule hematopoetice în jurul vaselor viteline care se scufundă înăuntrul unor cute ale peretelui sacului vitelin înspre interiorul acestui sac (D a n t - s c h a k o f f, 1908).

Perioada prefetală durează de la a 8-a la a 12-a zi de incubație. În această perioadă începe resorbția lichidului subembrionar, iar embrionul înghite lichidul din cavitatea amniotică. Începe nutriția intraintestinală. Organul hematopoetic al sacului vitelin se dezvoltă mult.

Perioada fetală durează, la embrionul de găină, de la a 13-a la a 19-a zi de incubație. În această perioadă (însă începînd cu a noua zi), respirația este alantoidiană. Nutriția se face pe seama asimilării albușului condensat, pătruns în cavitatea amniotică prin canalul sero-amniotic care leagă amniosul de sacul seros care conține restul de albuș. Sărurile de calciu se resorb din coaja oului și sînt duse spre embrion de circulația sanguină. Albușul este total consumat în a 16-a zi de incubație. Aparatul glandular al stomacului, înăuntrul căruia se face digestia albușului înghițit, se dezvoltă în mod corespunzător. În tot acest timp, restul sacului vitelin este păstrat aproape intact, fără ca aceste rezerve să fie atacate.

În perioada eclozиunii, nutriția se face din nou pe seama conținutului sacului vitelin. R a g o z i n a susține că o parte din vitelus pătrunde în această perioadă prin canalul omfalo-enteric în lumina tubului digestiv, unde este supus digestiei intraintestinale. În această perioadă, intestinul este umplut cu bilă. În preajma eclozиunii, restul sacului vitelin pătrunde sub acțiunea presiunii musculaturii abdominale prin ombilic în cavitatea abdominală a fătului, comprimînd în același timp, vasele principale alantoidiene. Prin acest mecanism se opresc, după R a g o z i n a, circulația sanguină și hematoza alantoidiană. Fătul trece la respirația pulmonară, respirînd din camera de aer.

Aceasta este o sumară trecere în revistă (după R a g o z i n a) a unor fenomene de mare importanță care se succed de-a lungul perioadelor dezvoltării preeclozionale. Trebuie însă ținut seama de faptul, semnalat pe drept cuvînt de R a g o z i n a, că modul prin care se realizează principalele funcții ale metabolismului în fiecare stadiu de dezvoltare nu-și pierde dintr-o dată importanța lui cînd organismul trece în perioada următoare. Modul precedent devine așadar, din principal, auxiliar.

Studiul caracteristicilor stadiale și al condițiilor realizării lor, cercetarea evoluției interacțiunilor din sînul complexului embrionar, sînt de o deosebită importanță pentru dirijarea procesului ontogenetic la embrionul de pasăre.

Cercetările noastre, a căror descriere urmează, constituie o contribuție modestă la acest studiu.

CERCETĂRI ASUPRA INTERRELAȚIILOR DINTRE CORPUL EMBRIONULUI ȘI SACUL VITELIN. ORGANUL HEMATOPOETIC AL SACULUI VITELIN

În capitolul în care ne-am ocupat de fagocitoza la embrion s-a vorbit despre rolul jucat de endodermul vitelin în transformarea vitelusului pe calea digestiei extra- sau intra-celulare.

Prezentăm acum un alt aspect funcțional al sacului vitelin, de mare importanță pentru relațiile dintre corpul embrionului și acest organ extraembrionar, și anume : sacul vitelin ca organ hematopoetic.

Primele elemente sanguine apar totdeauna în pereții acestui sac, în vecinătatea masei vitelusului, despărțite de aceasta numai de epiteliul endodermului vitelin (respective de sincițiul vitelin). La embrionii vertebratelor care produc ouă telolecite, foarte bogate în vitelus, porțiunea extraembrionară, a ecto-, mezo și endodermului, crește rapid pe suprafața masei viteline, înglobînd-o într-un sac vitelin (nu intrăm aici în detaliile variantelor acestui proces la diferite clase de vertebrate). La ouăle sărace în vitelus (mamifere), sacul vitelin sau vezicula ombilicală cum este numită aici, nu conține vitelus. Acest organ se atrofiază repede, la om, de pildă, în a doua lună a sarcinii (fig. 356).

Deși conținutul și modul de apariție al veziculei ombilicale a mamiferelor diferă fundamental de cel al sacului vitelin al sauropsidelor și peștilor, peretele veziculei ombilicale rămîne totuși sediul primelor fenomene hematopoetice și al dezvoltării primei circulații viteline sau ombilicale (insulele lui Wolff și Pander).

Prima circulație sanguină embrionară — circulația vitelină — mobilizează elementele sanguine primare, care s-au format în insulele lui Wolff și Pander (și le duce în corpul embrionului). Această circulație care se dezvoltă pe suprafața sacului vitelin servește nu numai pentru aportul substanțelor embriotrofice la embrion și pentru difuzarea unor produse ale corpului embrionar spre sacul vitelin, ci și la mobilizarea celulelor sanguine tinere, care se formează în peretele sacului vitelin, proces care nu se termină cu epuizarea insulelor Wolff și Pander, ci care persistă tot timpul existenței sacului vitelin. La ouăle telolecite, organul hematopoetic al sacului vitelin apare deci întins pe suprafața masei viteline despărțit de aceasta prin endodermul vitelin. Cele trei elemente, vitelusul, endodermul vitelin și elementele sanguine, care se formează deasupra lui în stratul mezodermic sau în cel endodermic, formează o unitate funcțională de nedespărțit și de importanță fundamentală pentru procesul hematopoetic la embrionul de pasăre.

Trebuie semnalat că la mamifere, inclusiv omul, unde vezicula ombilicală nu conține vitelus propriu-zis, s-au găsit în endodermul sacului vitelin (adică al veziculei ombilicale) celule vacuolare, conținînd granule omologabile — după părerea unor autori — cu vitelusul. Aceste granule ar trece și în lichidul care umple cavitatea veziculei ombilicale. Endodermul vitelin ar fi deci la mamifere oligolecite capabil să sintetizeze substanțe analoge vitelusului, necesare hematopoezei din sacul vitelin. După I. A. Thomas, endodermul vitelin ar fi capabil să secrete și în condițiile culturii de țesut un produs comparabil cu vitelusul.

Toate aceste observații pledează pentru rolul activ jucat de celulele endodermului vitelin, nu numai în timpul transferului de substanțe din vitelusul cavitar al sacului înspre

vasele viteline — în cazul ouălor tolocite —, ci și în transformarea vitelusului și pregătirea activă a substanțelor necesare pentru hematopoeză.

Dacă observăm endodermul vitelin al embrionului de găină în primele 4 — 5 zile de incubație, vedem că fiecare celulă conține, într-o vacuolă, una sau două globule viteline tipice. Aceste globule viteline pot prezenta fenomene de fragmentare. Mai tîrziu, conținutul celulelor endodermului vitelin este format, în cea mai mare parte, din picături lipidice (sau lipoproteice). Lîngă acestea găsim însă totdeauna pînă la sfîrșitul incubației, într-un număr mare de celule, globule cu caracter vitelin (fig. 357 și 358).

Mecanismul de pătrundere a elementelor viteline în interiorul celulelor endodermului a făcut obiectul cercetărilor expuse într-un capitol precedent. Pe lîngă mecanismul de pătrundere prin fagocitoză și prin „cuprindere", ar putea să existe și o resintetizare a elementelor viteline de către celulele endodermice.

Pe suprafața sacului vitelin al embrionului de găină se succed două generații de focare hematoformatoare :

1) insulele lui Wolff și Pander, al căror conținut se mobilizează o dată cu instalarea circulației viteline, la sfîrșitul celei de a doua zile de incubație, și

2) capilarele hematopoetice, care apar, începînd cu a patra sau a cincea zi, în jurul arterelor viteline. Aceste formațiuni hematopoetice se dezvoltă mult în jurul celei de a 11-a și a 12-a zi de incubație și persistă diminuînd pînă la sfîrșitul perioadei preeclozionale.

Judecîndu-le după întinderea lor și timpul cît persistă, trebuie să considerăm aceste formațiuni hematopoetice ale sacului vitelin drept organul hematoformator cel mai important al complexului embrionar, mai întins și mai dezvoltat ca măduva osoasă, splina și țesutul conjuctiv hematopoetic intraembrionar.

Acest organ a fost cercetat în mod deosebit la păsări de V. Dantschakoff în anii 1907 — 1908 — 1916.

O bună descriere a hematopoezei din sacul vitelin al păsărilor găsim și în tratatul de hematologie al lui J. Jolly (1923) și în lucrările citate ale lui M. N. Ragozina.

Autorii citați descriu „scufundarea" arterelor viteline începînd cu a cincea zi de incubație, transformarea capilarelor periarteriale, în care circulația stagnează, în focare hematopoetice unde se găsesc straturi hemocitoblastice periferice (înăuntrul endoteliului capilar) și straturi de eritroblaști, și eritrocite din ce în ce mai mature, așezate spre centrul lumenului capilarului dilatat.

În mezenchimul extracapilar, V. Dantschakoff descrie formarea leucocitelor tinere cu granulații eozinofile care după această autoare, s-ar produce totdeauna extravascular, spre deosebire de eritroblaști, care apar numai înăuntrul lumenului vaselor hematopoetice. Aceste capilare hematopoetice periarteriale formează, împreună cu arterele centrale, conținutul unor cute căptușite de endoteliul vitelin, cute care proemină înspre interiorul sacului vitelin (vezi și E. Remotti).

Căutînd căi de intervenție în modul de activitate al acestui vast aparat hematopoetic, deosebit de bine dezvoltat la embrionul păsărilor, am reluat studiul morfologic al acestuia.

Cu B. Litvac ne-am propus să evidențiem organul hematopoetic al sacului vitelin în totalitatea lui, împreună cu legăturile sale cu vasele viteline, cu peretele și conținutul sacului vitelin. Acest lucru ne apare cu atît mai necesar cu cît lucrările morfologice anterioare au fost efectuate aproape exclusiv pe bază de secțiuni histologice, fără folosirea

metodelor histo-topografice, a preparatelor totale și mai cu seamă cu o insuficientă folosire a observației vitale.

Am lucrat cu ouă de rasă Leghorn, incubate în lunile de primăvară. Sacii vitelini, de 9 — 10 — 12 zile de incubație, au fost fixați în Helly. Secțiunile în serii au fost colorate cu hematoxilină-eozină.

Pentru completarea aspectelor histologice obținute pe secțiuni ne-am servit de :

1. examenul pe viu al suprafeței sacului vitelin, cu ajutorul lupei binoculare sau al microscopului ultropac ;

2. injectarea cu tuș a vaselor viteline și examinarea lor pe preparate totale și secțiuni histo-topografice prin sacul vitelin ;

3. examenul feței interne a sacului vitelin proaspăt sau fixat cu acid osmic, cu sau fără injecție cu tuș a vaselor ;

4. reacția pseudoperoxidazelor centrilor hematopoetici (singură sau combinată cu injecția cu tuș a vaselor viteline) pe preparate totale, examinate înainte și după clarificare.

Observația directă pe viu a sacului vitelin s-a făcut la embrioni de 2 — 3 — 4 — 5 zile de incubație, prin fereastra tăiată în coaja oului, fie cu lupa binoculară, fie cu microscopul ultropac, cu ajutorul căruia se obțin imagini de o claritate deosebită (și la măriri mai mari). Pentru a observa unul și același cîmp microscopic un timp mai îndelungat, ne-am folosit de un microtermostat în care oul deschis rămîne tot timpul observației (1 — 2 zile) la temperatura de 38° și la umiditatea necesară. Cristalul de imersie al ultropacului pătrunde, printr-un orificiu circular, în interiorul microtermostatului și, de acolo, prin fereastra tăiată în coajă, în interiorul oului, introducînd acolo fasciculul de lumină necesar observației. Astfel menținem, o dată cu supraviețuirea embrionului, condiții de observație continuă.

Injecțiile cu tuș la vasele viteline le facem într-o venă alantoidiană. Începînd cu a noua zi de incubație, aceste vene devin injectabile. Vasul injectabil se reperează prin miraj și se marchează cu creionul pe coaja oului. În acest loc se ridică un fragment de coajă, lăsîndu-se însă intactă membrana papiracee. După transparentizarea membranei papiracee cu ulei de parafină, se mirează oul din nou. Vena alantoidiană aleasă este acum clar vizibilă. Injecția se face cu o canulă de sticlă. Se observă umplerea venei, injectarea corpului embrionar, apoi pătrunderea tușului în arterele alantoidiene. În acest moment se produce și injectarea întregului sistem vascular al sacului vitelin.

Reacția histochimică a peroxidazelor ne este de mare folos pentru studiul hematopoezei embrionare. Efectul catalitic puternic al hemoglobinei se manifestă printr-o înalbăstrire a tuturor elementelor care conțin hemoglobină după tratarea cu benzidină acidulată în prezența apei oxigenate diluate (Spirito, 1934). Această reacție, numită aici a „pseudoperoxidazelor", este termostabilă.

Noi ne-am folosit de reacția pseudoperoxidazelor pentru depistarea elementelor sanguine tinere care conțin hemoglobină, în insulele lui Wolff și Pander, și pentru evidențierea aparatului hematopoetic definitiv al sacului vitelin. Peretele proaspăt al sacului vitelin se acoperă cu soluția de benzidină acidulată, iar după cîteva minute, cu soluția diluată de apă oxigenată. Imediat apar elemente sanguine colorate în albastru-închis, focarele hematopoetice evidențiindu-se prin această colorație în continuitatea lor. Preparatul se clarifică în glicerină, după care nuanța albastră dispare, fiind înlocuită de o colorație brună. Metoda permite o diferențiere netă a întregului aparat hematopoetic și studiul raporturilor acestui aparat cu celelalte elemente ale sacului vitelin, pe preparatele totale clarificate.

Deosebit de folositoare a fost pentru noi combinarea acestei reacții cu injecția cu tuș a vaselor viteline.

Folosirea acestor metode, și studiul secțiunilor, ne-a permis o observare mai completă a dezvoltării și a conexiunilor țesutului hematopoetic vitelin.

Începînd cu a cincea zi de incubație se poate observa fenomenul „scufundării" arterelor viteline principale în adîncimea sacului vitelin. Încă înainte de dispariția trunchiului arterial principal în profunzime se poate observa (vital) o modificare a rețelei capilare care leagă trunchiurile arteriale de cele venoase, situate pe suprafața ariei vasculare a sacului vitelin. Capilarele situate în imediata apropiere a trunchiurilor arteriale iau aspectul unor vase adventițiale ale acestor trunchiuri. Circulația, în aceste capilare, devine mai înceată. Această rețea capilară adventițială participă la procesul de scufundare a trunchiurilor mari arteriale. În lumina acestor capilare apar și se adună elemente tinere, cu aspect hemocitoblastic care vor da naștere formelor din ce în ce mai mature de eritrocite. Acestea umplu complet lumina capilarelor devenite moniliforme și care sînt acum pe de o parte, strîns lipite de peretele arterei, și pe de altă parte în legătură cu restul rețelei capilare, care se întinde pînă la colectorul venos (fig. 357 și 358), Pe măsură ce se adîncește cuta de scufundare care conține în grosimea ei trunchiul arterial cu capilarele hematopoietice adiacente și capilarele de legătură antrenate și ele în profunzime ea se închide la suprafață prin alipirea celor două buze de răsfrîngere, proces asemănător transformării jgheabului neural în tub neural. La nivelul suturii superioare a cutei viteline, rețeaua capilară, rămasă la suprafața sacului, este alimentată de vase de legătură care vin din profunzime, de la trunchiul arterial scufundat și capilarele hematopoetice „parietale" adiacente acestuia. Venele colectoare rămîn, în cea mai mare parte, pe suprafața sacului vitelin (fig. 359, 360 și 361).

Observînd vital o asemenea regiune, sîntem impresionați de aspectul unor vase sanguine care parcă apar brusc pe suprafața sacului, aducînd sînge din adîncime spre rețeaua capilară superficială, asemănător unor izvoare alimentate de curenți subterani.

Rețeaua capilară superficială a sacului vitelin îndeplinește, pe lîngă funcția trofică, pentru elementele sacului, pînă la a opta zi de incubație, și funcția respiratoare, înainte ca alantoida să acopere sacul vitelin și să capete structura adaptată la funcția ei specifică.

În capilarele profunde, juxtaarteriale, găsim aspecte descrise de D a n t s c h a k o f f și J o l l y. Aceste vase apar, pe secțiune, pline cu hemocitoblaști (fig. 362), care se transformă în eritroblaști și eritrocite. Întregul focar hematopoetic este învelit într-un strat endotelial simplu. Celulele hematopoetice tinere prezintă o activitate cariokinetică intensă. Nu se găsesc amitoze. Întregul spațiu existent de jur împrejurul trunchiului arterial central și delimitat de endodermul vitelin este ocupat de aceste celule eritropoetice, în afară de înguste fîșii mezenchimatoase, în care găsim aglomerări de celule, semănînd cu mielocitele eozinofile. Aceste focare leucopoetice nu sînt delimitate de endoteliu. Celulele eozinofile sînt însă așezate totdeauna în imediata apropiere a lumenului vasului arterial.

Vasele eritropoetice și focarele leucopoetice cu celulele eozinofile, așezate de jur împrejurul trunchiului arterial, conferă acestuia — examinat în totalitate — un aspect cu totul neobișnuit.

Peretele arterial prezintă îngroșări sau chiar adevărate apendice, fie moniliforme (fig. 363, și 364), fie ca ghimpi ascuțiți, așezați de jur împrejurul arterei, pe toată lungimea ei. Acest aspect accidentat al arterelor viteline contrastează cu aspectul neted al venelor, a căror ambianță nu participă la formarea centrelor hematopoetice.

Preparatele noastre pledează pentru natura vasculară a centrilor eritropoetici periarteriali, cu toate că în unele părți — pe secțiuni — se naște impresia unui infiltrat dens dezvoltat în mezenchimului adventițial. Acest lucru corespunde realității numai în cazul granulocitelor eozinofile.

Îngroșările moniliforme juxtavasculare sînt spații capilare hematopoetice dilatate, delimitate de un perete endotelial. Ghimpii descriși mai înainte corespund locurilor în care țesutul hematopoetic pătrunde pînă în lumenul capilarelor de legătură, capilare care, pe de o parte, se deschid în focarele hematopoetice juxtaarteriale, iar pe de alta, se varsă în venele superficiale (fig. 361).

Nu putem încă preciza modul de pătrundere în circulație și de mobilizare a celulelor sanguine care se formează în capilarele hematopoetice sau în infiltratele eozinofile. Este posibil ca aceste celule să pătrundă succesiv în rețeaua capilară de legătură sau ca ele să se verse direct în arteră prin deschiderea focarelor hematopoetice în lumenul acestora. Se poate lua în discuție și posibilitatea unei imigrări a elementelor sanguine prin peretele vascular.

Dispozitivul hematopoetic vascular al sacului vitelin pe care l-am descris pînă acum se dezvoltă mai departe în două moduri : prin ramificația arterelor viteline, ceea ce duce la complicarea cutelor viteline care proemină, îmbrăcate în endoteliul vitelin, în masa de vitelus, și prin extinderea activității hematopoetice dincolo de capilarele juxtaparietale înspre rețeaua capilară de legătură (fig. 365, 366, 367 și 368).

În acest al doilea stadiu de dezvoltare al organului hematopoetic al sacului vitelin, arterele viteline centrale, prevăzute cu nodozitățile și apendicele hematopoetice descrise, apar înconjurate de o rețea spațială de capilare hematopoetice cu așezare spiralată, rețea străbătută în centrul ei de trunchiul arterial. Întreaga această formațiune constituie conținutul cutelor foarte complicate, ramificate și anastomozate, care se întind pe fața profundă a peretelui sacului vitelin în mod radiar de la ombilicul cutanat juxtaembrionar pînă la ombilicul „ombilicat" la polul opus al masei viteline. Acest întreg sistem de cute ramificate al endodermului vitelin apare deci afectat sistemului arterial vitelin și în mod deosebit capilarelor și focarelor hematopoetice periarteriale.

Cîștigul de suprafață absorbantă care se realizează prin dezvoltarea acestor cute este în legătură nu numai cu resorbția substanțelor embriotrofice din masa de vitelus, ci și cu activitatea hematopoetică și necesitățile ei.

BIBLIOGRAFIE

1. Dantschakoff W., *Über das erste Auftreten der Blutelemente im Hühner-Embryo*, Fol. Haematol, 1907, vol. 4, supl.
2. — *Untersuchung über die Entwicklung des Blutes und Bindegewebes bei den Vögeln*, Anat. Hefte, Merkel Bonnet, 1908, caiet. 113, vol. 37.
3. Jolly J., *Traité d'hématologie*, Paris, Masson, 1923.
4. Lepeșinskaia O. B., *Geneza celulelor din substanța vie și rolul substanței vii în organism*, Ed. Acad. R.P.R., București, 1952.
5. Maximov A., *Bindegewebe und blutbindendes Gewebe*, în *Handb. d. Mikr. Anat. des Menschen*, 1927, Berlin, nr. 2, 1927, p. 274.
6. Menkes B., Brătianu-Rîmniceanu C., *Despre independența dezvoltării ariei vasculare și a insulelor Wolff-Pander de corpul embrionului*, Congr. anat. patol., București, 1948.

7. Menkes B., Linția D., Stenzer E. și Linția I., *Aplicarea metodelor miciuriniste în dezvoltarea embrionară la animale. Efectul injectării vitelusului lichefiat în vezicula alantoidiană a embrionului de găină, Studiul unui lot experimental, cuprinzînd trei generații succesive*, Studii și cercetări științ. Acad. R.P.R., Baza Timișoara, 1953, t. I. nr. 1–4, p. 407.
8. Menkes B. și Litvac B., *Cercetări asupra circulației viteline la embrionul de găină*, Bul. științ. Acad. R.P.R., Secțiunea de științe medicale, 1953, t. V, nr. 1, p. 149.
9. — *Cercetări asupra circulației alantoidiene la embrionul de găină*, Studii și cercetări Științ. Acad. R.P.R., Baza Timișoara, 1956, t. III, nr. 1–2, p. 25.
10. Menkes B. și Mîrza V. D., *Aplicarea metodelor miciuriniste în dezvoltarea embrionară la animale. III. Efectul injectării vitelusului lichefiat în vezicula alantoidiană a embrionului de găină*, Bul. științ. Acad. R.P.R., Secțiunea de științe medicale, 1952, t. IV, nr. 3, p. 601.
11. Ragozina M. N., *Sposobi pitaniia i dihaniia selskohozeaistvennih ptiț v razlicinie periodi razvitiia vo vremia inkubații*, Izv. Akad. Nauk SSSR, seria biol., nr. 4, 1955.
12. — *Rol belkovoi obolociki zaița v razvitii tiplenka*, Trudi Inst. Morfol. jivotnîh im. A. N. Severțova, 1954, nr. 12, p. 261.
13. — *Vliianie zaglativaniia belka na razvitie piscevaritelnogo trakta zerkalnoiutki*, Trudi Instit. Morfol. jivotnîh im. A. N. Severțova, 1955, nr. 14.
14. Remotti R., *Ricerche fis omorfoolgiche sul sacco vitellino del pollo*, Ricerche di morfol., 1927 t. VII, p. 201.
15. Spirito A., *Studii sul comportamento delle perossidazi durante lo sviluppo embrionale*, Boll. Soc. Ital. Biol., 1934, Sper. 9.
16. Smidt G. A., *Embriologia animală*, vol. I, București, Ed. agrosilvică de stat, 1951.
17. — *Embriologhia jivotnih*, Sovețkaia nauka, Moscova, vol. II, 1951.

Fig. 356. — Embrion uman cu anexele sale, luna a doua; (↓) = sacul vitelin.





Fig. 357. — Embrion de găină de 7 zile de incubaţie. Sacul vitelin. Formarea „cutei viteline". Cele două versante formate de endodermul vitelin s-au alipit. Cuta conţine artera vitelină, cu capilarele hematopoetice adiacente, pline de elemente sanguine tinere. Vacuolele endodermului vitelin sînt goale (dizolvarea lipidelor în timpul preparaţiei pentru includerea în parafină).

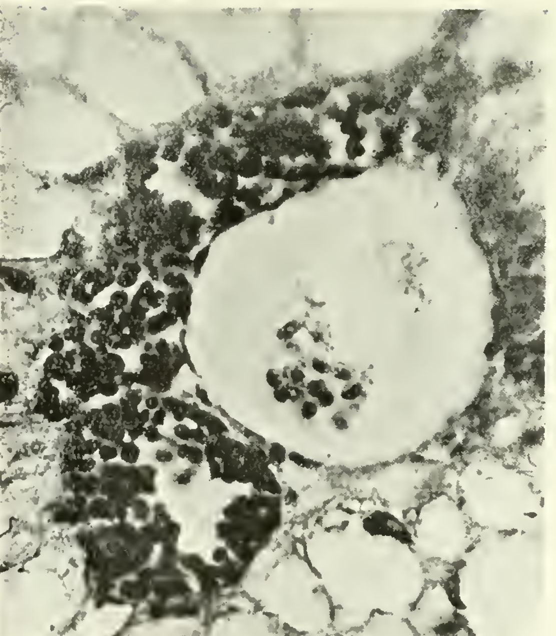


Fig. 358. — Detalii din figura 357. În interiorul arterei, eritrocite circulante. Focarele hematopoetice juxtaarteriale pline de elemente sanguine tinere.



Fig. 359. — Sac vitelin; 13 zile de incubaţie. Injecţia totală cu tuş; reţeaua superficială şi venele colectoare. Apariţia bruscă din profunzime a unor trunchiuri de legătură.



Fig. 360. — Suprafaţa sacului vitelin la 13 zile de incubaţie. Injecţie cu tuş. Venele viteline, reţeaua de capilare superficiale şi vasele de legătură care apar din profunzime (din cutele vitelinei scufundate în masa vitelusului); se văd liniile de scufundare.

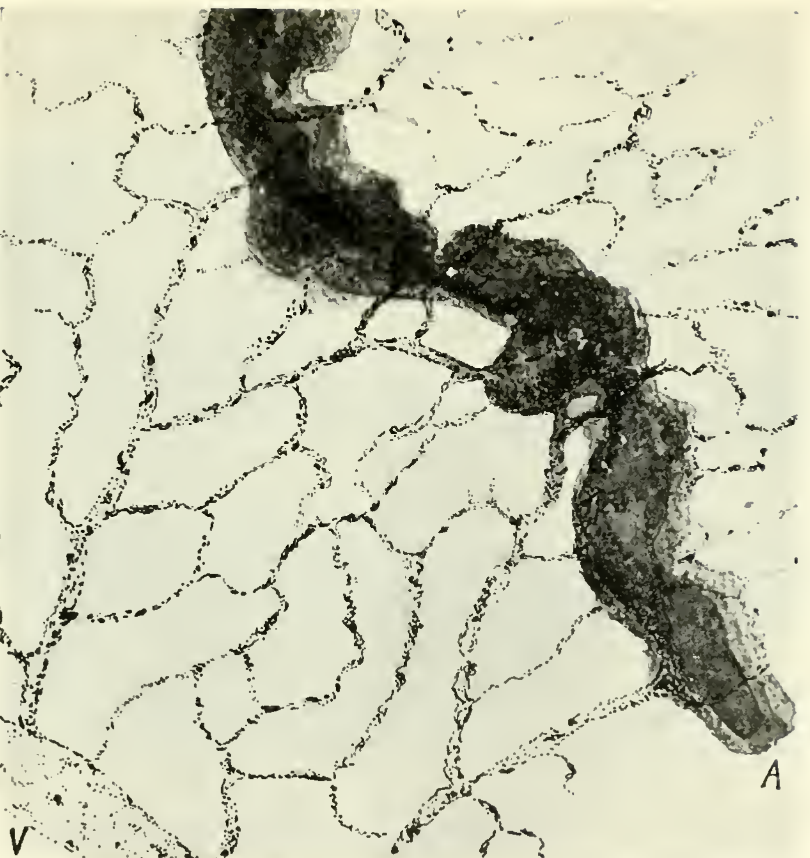


Fig. 361. — Peretele sacului vitelin de 12 zile de incubaţie. Injecţie totală cu tuş. Reacţie cu benzidină, preparat total, clarificare în glicerină. Desen, la cameră clară.

A = artera vitelină, cu focarele hematopoetice adiacente. Relaţiile acestora cu vasele capilare de legătură, care se varsă în venele superficiale. V = vene colectoare ale sacului vitelin.

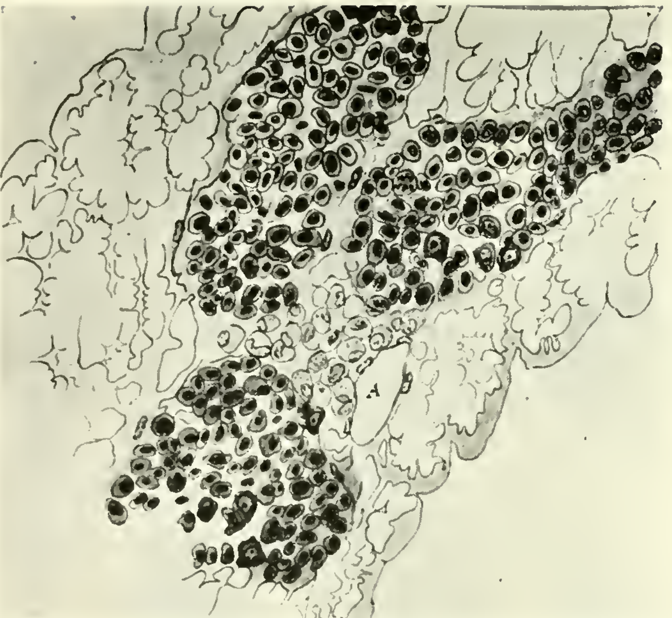


Fig. 362. — Secțiune printr-o cută vitelină la 13 zile de incubație. Hematoxilină-eozină; ob. 7, oc. 15. Desen la cameră clară.

A — Lumenul arterei. În jurul ei, focar de leucocite eozinofile (mielocitiforme). Trei capilare hematopoetice dilatate.

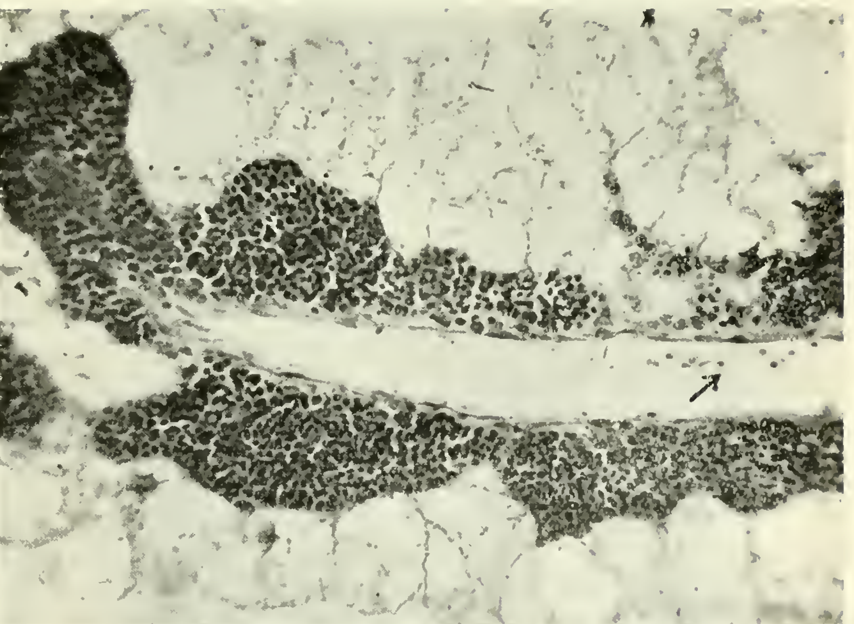


Fig. 363. — Cută vitelină. Secțiune longitudinală printr-o arteră vitelină (conține hematii diferențiate) (↗). Așezarea juxtaarterială a focarelor hematopoetice formînd „apendice moniliforme”.

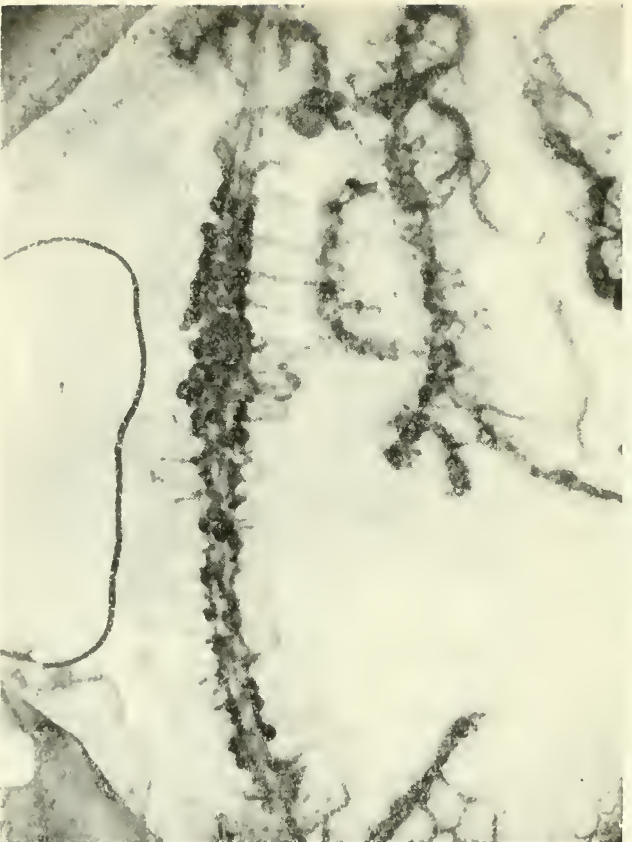


Fig. 364. — Cută vitelină la 17 zile de incubaţie. Preparat total. Reacţia benzidinei. Apendice moniliforme „ghimpii" juxtaarteriali.



Fig. 365. — Sac vitelin la 25 zile de incubaţie.
V. = Vene viteline. A = Arteră vitelină în cuta hematopoetică



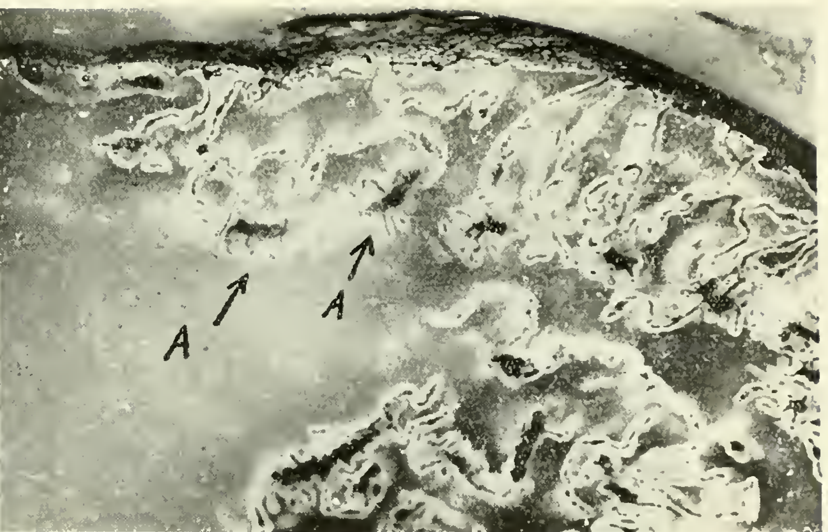
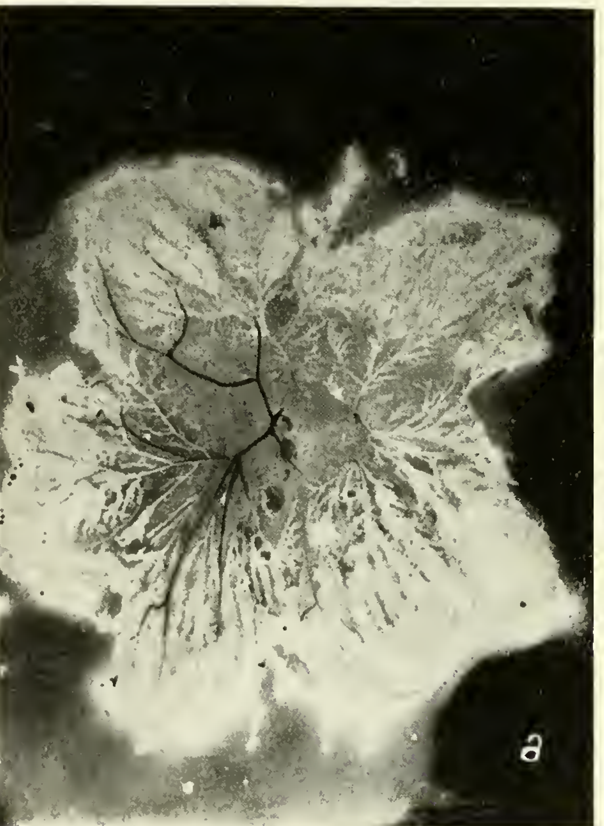


Fig. 367. — Sac vitelin, embrion de 13 zile de incubație; injecție cu tuș. Secțiune perpendiculară pe suprafața sacului (imagine lupă). Se văd: rețeaua vasculară superficială, cutele viteline (*AA*), cu arterele viteline „scufundate", înconjurate de focarele hematopoetice și endodermul vitelin (albicios).

Fig. 366. — Cuta vitelină la 15 zile de incubație. Artera vitelină cu nodozități hematopoetice. Se află în centrul unei rețele spațiale de capilare.



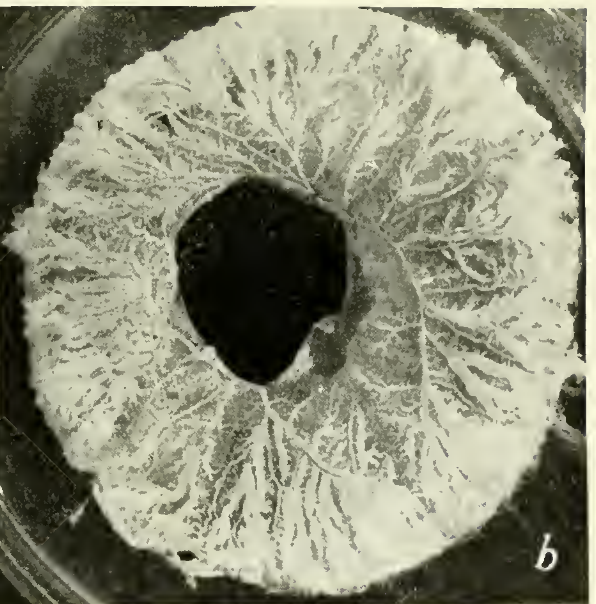


Fig. 368. — *a* şi *b* — Sac vitelin. Vedere de ansamblu. Dispoziţia cutelor viteline hematopoetice.

CERCETĂRI EXPERIMENTALE ASUPRA EFECTULUI ÎNTRERUPERII LEGĂTURII VASCULARE DINTRE CORPUL EMBRIONULUI ȘI ARIA VASCULARĂ EXTRAEMBRIONARĂ

În cercetările a căror descriere urmează am aplicat, împreună cu B. L i t v a c, mai multe metode de întrerupere a legăturilor vasculare între corpul embrionului, anume inima embrionului și aria vasculară extraembrionară.

Încă în 1927, E. R e m o t t i a observat că aria vasculară poate supraviețui, după ce corpul embrionului se suprimă, în primele două zile de incubație.

Analizînd pe de o parte comportarea embrionului lipsit de legături cu vasele și focarele hamatopoetice extraembrionare și, pe de alta, comportarea peretelui sacului vitelin împreună cu aceste formațiuni lipsite de efectele circulației sanguine și de influențele sosite de la corpul embrionului pe calea curentului sanguin, putem recunoaște, atît la embrion, cît și în organele extraembrionare, efectele datorite interacțiunilor — în cazurile experimental întrerupte — dintre acești doi componenți principali ai complexului embrionar. Sarcina noastră este, deci, de a observa în embrion și în peretele sacului abaterile de la normal care apar după separarea lor circulatoare.

Împreună cu B. L i t v a c am putut obține, experimental, întreruperea legăturilor vasculare dintre embrion și aria extraembrionară, prin următoarele intervenții :

a) Atingerea cu electrocauterul (sau numai încălzirea fără atingere) a regiunii cardiace a embrionului, între 24 și 40 de ore de incubație. La embrionii de această vîrstă, primordiul inimii se găsește în imediata apropiere a orificiului de intrare în punga intestinului cefalic (și anume în peretele ei ventral). Spre această regiune se îndreaptă, din ambele părți ale ariei extraembrionare, sinusoidele vasculare din aria pelucidă, primordiile venelor viteline (omfaloenterice).

Indiferent de concepția pe care o avem asupra originilor vaselor extraembrionare și intraembrionare, admițînd fie o joncțiune a vaselor extraembrionare cu inima sau dezvoltarea centrifugală a vaselor pornind din corpul embrionului și cîștigînd regiunile extraembrionare (O. B. L e p e ș i n s k a i a), putem face constatarea că, în această perioadă a dezvoltării, între 24 și 40 de ore de incubație, legătura capătului venos al inimii cu sinusoidele omfalo-enterice se rupe ușor, datorită acțiunilor diferiților agenți mecanici, termici, chimici etc.

b) Ruperea contactului dintre inimă și vasele extraembrionare o obținem și prin variații bruște ale temperaturii de clocire sau prin zguduiri mecanice ale oului după sfîrșitul primei zile de incubație.

c) Excizia plăcii sau corpului embrionar începînd cu prima zi de incubație, lăsînd pe loc membranele extraembrionare, ne dă ca rezultat constant, apariția unei arii vasculare, care se dezvoltă, bineînțeles, fără a suferi influența corpului embrionar care a fost îndepărtat.

Folosind una din metodele indicate putem obține, fie coexistența corpului embrionar și a ariei vasculare extraembrionare cu care embrionul și-a pierdut însă legătura vasculară, fie numai o arie vasculară lipsită de circulație, în absența corpului embrionului.

Indiferent de metoda întrebuințată, fie în absența corpului embrionului, fie în prezența unui embrion a cărui dezvoltare devine însă anormală, cum se va arăta mai jos, putem observa, în mod constant, continuarea creșterii insulelor și vaselor sanguine extraembrionare

dezvoltarea elementelor figurate ale sîngelui şi întinderea ariei vasculare pe suprafaţa gălbenuşului în absenţa efectului mobilizator şi hemodinamic al circulaţiei.

Pe baza experienţelor noastre putem afirma că aria vasculară şi hematopoeza primară se pot dezvolta şi după extirparea plăcii embrionare la 16 ore de incubaţie, respectîndu-se aria extraembrionară.

Desigur că toate ariile vasculare pe care le obţinem în urma intervenţiilor menţionate sînt lipsite de circulaţie.

În cele ce urmează vom descrie, pe de o parte, aceste arii vasculare fără circulaţie, şi pe de alta, observaţiile pe care le-am putut face asupra comportării corpului embrionului în absenţa unei circulaţii sanguine viteline normale.

DEZVOLTAREA ARIILOR VASCULARE FĂRĂ CIRCULAŢIE

Am urmărit dezvoltarea ariilor vasculare *in situ* prin observaţia vitală cu sau fără coloraţie vitală. Lipsa factorului hemodinamic imprimă reţelelor vasculare sinusoide, care se formează în aceste condiţii, caractere care nu se găsesc la arii normale. Reţeaua vasculară care se dezvoltă fără influenţa factorului hemodinamic prezintă funduri de sac oarbe şi îşi păstrează forma reticulată în tot timpul creşterii ei, pe care noi am urmărit-o pînă la 10 zile din momentul întreruperii legăturii cu inima. La periferia ariei vasculare se formează totdeauna un sinus marginal, chiar în cazurile de arii excentrice, care se dezvoltă uneori după excizia plăcii embrionare (fig. 369, 370, 371, 372 şi 373).

Cînd deschidem un trunchi vascular al unei asemenea arii fără circulaţie, se produce o hemoragie puternică şi se poate observa cum sîngele din vasele vecine leziunii se scurge spre locul lezat, unde presiunea sanguină scade. Această observaţie ne trădează existenţa unei tensiuni a pereţilor vasculari şi a unei presiuni sanguine.

În timp ce aria lipsită de circulaţie creşte şi se întinde pe suprafaţa gălbenuşului, elementele sanguine se înmulţesc în lumina vaselor ei. Pe măsura înmulţirii a elementelor sanguine se manifestă tendinţa acumulării sîngelui în centrul reţelei, ceea ce duce la formarea mai multor saci hematici chistici, în care se varsă trunchiurile centrale ale reţelei.

Preparate foarte clare ale acestor arii le obţinem prin folosirea metodei de evidenţierii a pseudoperoxidazelor cu benzidină şi apă oxigenată (S p i r i t o).

Fixarea ariilor se poate face *in situ*, folosind o soluţie de 1% acid osmic care evidenţiază elementele conţinînd substanţe lipidice. Examenul microscopic îl facem *in situ* la ariile vii, cu sau fără coloraţie vitală, sau după fixare pe preparate totale clarificate sau secţionate în serii.

Prin coloraţia vitală a ariilor vii se pot pune în evidenţă elemente viteline, globule viteline, singranule, care plutesc libere în lumina vaselor sinusoidale. În afară de aceste formaţiuni se găsesc în aceste vase şi grupuri de eritrocite necrobiotice cu fenomene de picnoză şi cariorexă, colorîndu-se deosebit de intens cu roşu neutru. Elementele figurate sanguine care se găsesc în lumenul vaselor prezintă diferite trepte de maturaţie ale seriei roşii, începînd cu eritroblaştii pînă la forma matură — de circulaţie — a eritrocitului embrionar. Foarte multe celule sanguine se găsesc în cariokineză; unele prezintă aspecte de diviziune amitotică.

Urmărind dezvoltarea acestor arii pînă la a opta, a noua şi chiar pînă la a zecea zi de incubaţie putem constata că endodermul vitelin şi vasele care conţin eritrocite embrionare îşi păstrează forma lor primitivă.

Cu toate că observația noastră depășește mult a cincea zi de incubație, dată de la care formarea focarelor hematopoetice secundare, descrise în subcapitolul precedent, începe în mod normal, în ariile fără circulație nu am putut observa niciodată apariția acestor focare, nici formarea cutelor de scufundare ale vaselor viteline. Acest fenomen, atît de important în dezvoltarea normală a sacului vitelin, este deci legat de existența unei circulații sanguine normale viteline și de influențele exercitate pe calea acestei circulații de către corpul embrionar asupra vaselor extraembrionare (fig. 374 și 375). În schimb, formarea lichidului subembrionar nu pare să fie stînjenită de absența circulației viteline sau chiar a corpului embrionar. Acest lucru pledează pentru rolul preponderent pe care-l joacă, în acest proces, însuși peretele sacului vitelin.

În ceea ce privește prezența elementelor viteline (globule viteline, albe, singranule) în lumina vaselor acestor arii fără circulație, trebuie spus că cercetări pe care le-am întreprins asupra ariilor extraembrionare normale, respectiv asupra plăcii embrionare, începînd cu a zecea oră de incubație, ne-au permis să verificăm și noi observația acad. O. B. Lepeșinskaia, confirmate de acad. V. D. Mîrza și colaboratorii săi asupra prezenței unor globule viteline în faza de singranul în stratul mezodermic, deci deasupra endodermului vitelin, în zona dezvoltării primelor insule sanguine ale lui Wolff și Pander fig. 376, 377, 378 și 379).

Fie pe secțiuni în serie, fie pe preparate totale (la 24 de ore de incubație) se pot recunoaște asemenea singranule, uneori chiar incluse în masa elementelor sanguine primitive, care intră în constituția unei insule hematopoetice. Pe măsură ce elementele constitutive ale acestor insule se mobilizează, devenind flotante în lichidul sanguin (plasma primitivă), împărtășesc această soartă și elementele viteline, care pot fi ulterior antrenate de circulația sanguină vitelină ajungînd astfel în corpul embrionului, (antrenarea globulelor viteline în circulația sanguină a fost descrisă de V. Dantschakoff).

Împreună cu B. Litvac am putut observa acest fenomen direct *in situ* pe o placă embrionară normală, colorată vital, în vîrstă de 30 de ore de incubație.

Placa embrionară întreagă, colorată vital cu albastru de Nil, la 30 de ore de incubație, permite să se distingă, la nivelul cadrului vitelin, deci la zona de trecere între aria pelucidă și aria opacă, prezența unor formațiuni viteline mari, care se colorează deosebit de intens față de ambianța lor și care, așezate în formă de potcoavă, înconjură jumătatea caudală a ariei pelucide. Aceste elemente viteline se află pe un plan superior față de endodermul vitelin. Acționînd asupra lor mecanic, lovindu-le cu o perlă de sticlă, putem obține mobilizarea acestor corpuri intravasculare (fig. 380 și 381). Globula vitelină astfel mobilizată începe să se miște, mai întîi încet, arătîndu-se antrenată de unda de întoarcere provocată de sistola sinusului venos. Încetul cu încetul, singranulul vitelin pătrunde în vasele, din ce în ce mai mari, de pe aria pelucidă; pe măsură ce se apropie de corpul embrionului își accelerează viteza, pentru ca în cele din urmă să pătrundă în circulația intraembrionară, realizînd o adevărată embolie vitelină.

OBSERVAȚII ASUPRA COMPORTĂRII CORPULUI EMBRIONULUI DUPĂ ÎNTRERUPEREA EXPERIMENTALĂ A CIRCULAȚIEI VITELINE

În cele ce au precedat am descris comportarea ariilor vasculare „fără circulație".

Ca și membranele extraembrionare, și corpul propriu-zis al embrionului supraviețuiește după întreruperea legăturii sale vasculare cu circulația extraembrionară. În

primele 10—20 de ore după intervenția descrisă mai înainte, prin care obținem întreruperea continuității dintre vasele intra- și extraembrionare (sau menținerea fazei de separare), dezvoltarea și creșterea corpului embrionar continuă în direcția axială, diferențiindu-se încă un număr de somite la extremitatea caudală. După această scurtă perioadă în care continuă procesele de diferențiere, acestea încetează însă și persistă numai unele fenomene de creștere simplă. Tubul cardiac continuă să bată, contractîndu-se asupra unui conținut incolor, anhematic. Somitele, diferențiate pînă în acest moment, își păstrează cavitatea lor, ceea ce le dă un aspect primitiv, iar în locul segmentului intermediar pronefrotic, care în mod normal leagă somita de plăcile antero-laterale ale mezodermului, apar niște prelungiri costiforme ale somitelor, care se întind în direcție transversală (fig. 382 și 383).

Somitele caudale devin uneori anormale, fragmentîndu-se în piese neregulate. La toți acești embrioni am observat formarea amniosului. În a doua zi de supraviețuire a corpului embrionar, după întreruperea circulației viteline, încep să se manifeste fenomene de diferențiere și necrobioză, care duc, încetul cu încetul, la reducerea aproape completă a corpului embrionar. Uneori persistă numai tubul cardiac pulsatil în mijlocul unui țesut embrionar dediferențiat.

Comparația comportării membranelor extraembrionare cu cea a corpului embrionar după întreruperea circulației viteline ne permite să constatăm la ambii acești componenți ai complexului embrionar o disociere între creștere și dezvoltare.

Aria vasculară crește fără a mai diferenția focarele hematopoetice secundare (numai eritrocitele prezintă fenomene de maturație în lumina vaselor). În corpul embrionului, după o scurtă continuare inițială a proceselor de diferențiere, persistă numai fenomene de creștere, fără dezvoltare; aici însă și creșterea încetează repede, mult mai devreme decît la membranele extraembrionare.

Din aceste observații rezultă că circulația vitelină reprezintă o condiție absolut necesară continuării dezvoltării embrionului și a anexelor sale, fără a condiționa, în aceeași măsură (înăuntrul anumitor limite) și unele fenomene de creștere.

Cum se știe, disocierea dintre creștere și dezvoltare a fost considerată de T. D. Lîsenko ca semnul lipsei unei condiții stadiale, necesare trecerii de la un stadiu de dezvoltare la cel următor.

OBSERVAȚII ASUPRA EFECTULUI IRADIERII ARIEI VASCULARE CU RAZE ULTRAVIOLETE

Transformarea insulelor sanguine primare (insulele lui Wolff și Pander) în vase sanguine conținînd eritrocite poate fi oprită prin iradierea ariei vasculare cu raze ultraviolete.

Împreună cu B. Litvac am expus acțiunii razelor ultraviolete sectoare ale ariei vasculare la embrionul de 48 de ore de incubație. Limitarea acțiunii razelor se obține prin folosirea ecranelor de staniol. Putem iradia în felul acesta prin fereastra tăiată în coaja oului, în mod separat, orice parte a suprafeței embrionului sau a membranelor extraembrionare (fig. 384).

La 24 de ore după iradierea unui sector extern, de exemplu a jumătății stîngi a ariei vasculare de 48 de ore de incubație putem observa o netă rămînere în urmă a creșterii porțiunii expuse (fig. 385). Această regiune poate să devină chiar necrotică în

funcție de durata și intensitatea iradiației. Porțiunile neiradiate își continuă însă dezvoltarea lor, circulația vitelină reorganizîndu-se și adaptîndu-se noilor condiții cu ajutorul vaselor rămase nevătămate din partea protejată de ecranul de staniol. Aceste vase ajung în unele cazuri să deservească și regiunile inițial vătămate, irigate în mod normal și de alte ramuri vasculare viteline. În aceste cazuri, ramificația și repartizarea vaselor viteline pe suprafața ariei vasculare devin cu totul atipice. În alte cazuri, însă, aria vasculară, din partea iradiată, dispare complet (fig. 386 și 387).

Examenul histologic al ariilor fixate la 24 de ore după intervenție, pune în evidență aspectul normal al vaselor viteline din partea neiradiată (fig. 388). Aici insulele lui Wolff și Pander s-au transformat în mod normal în vase. În jumătatea iradiată însă (fig. 389, 390 și 391) insulele sanguine persistă sub aspect compact, păstrînd tipul insulelor lui Wolff și Pander, fără a prezenta însă frecventele mitoze, care se observă în mod normal în aceste focare hamatopoetice primordiale. Unele celule prezintă fenomene de picnoză și cariorexă. Endodermul vitelin nu pare să fie vătămat. Sîntem deci aici în fața unei opriri a dezvoltării insulelor sanguine sub influența razelor ultraviolete, dezvoltare care poate să-și reia ulterior mersul ei normal, dacă nu se instalează fenomene de necroză.

Am putut observa însă, că oprirea în dezvoltarea insulelor lor Wolff și Pander se produce nu numai în teritoriul direct expus razelor ultraviolete — care uneori se necrozează —, ci și în zonele adiacente, protejate de ecranul de staniol. Ne gîndim aici la un efect la distanță, exercitat de zona direct vătămată prin difuziunea unei substanțe eliberate la nivelul ei.

Aruncînd o privire generală asupra tuturor experiențelor făcute cu ariile sanguine „fără circulație”, le putem considera ca un model experimental util pentru analiza factorilor activi în procesul formării și maturației celulelor sanguine.

Metoda „ariei fără circulație” poate fi folosită de asemenea pentru testarea valorii biologice a unor substanțe capabile să influențeze procesul de hematopoeză.

BIBLIOGRAFIE

1. D a n t s c h a k o f f W., *Über das erste Auftreten der Blutelemente im Hühner-Embryo*, Fol. Haematol., 1907, vol. 4, supl.
2. L e p e ș i n s k a i a O. B., *Geneza celulelor din substanța vie și rolul substanței vii în organism*, Ed. Acad. R.P.R., 1952, p. 123.
3. L i s e n k o T. D., *Agrobiologia*, București, Ed. de stat, 1952.
4. M e n k e s B. și L i t v a c B., *Cercetări asupra circulației viteline la embrionul de găină*, Bul. științ. Acad. R.P.R., Secțiunea de științe medicale, 1953, t. V, nr. 1, 1953, p. 149.
5. M î r z a V. D. și P o p I., *Geneza cavității subgerminale la embrionul de găină*, în *Lucrările Sesiunii științifice a Secției de științe medicale a Academiei R.P.R. din 22—24 ianuarie 1954*, Ed. Acad. R.P.R., 1955, p. 607.
6. R e m o t t i E., *Ricerche fisio-morfologiche sul sacco. vitellino del pollo*, Richerche de morfologia, 1927, vol. VII.



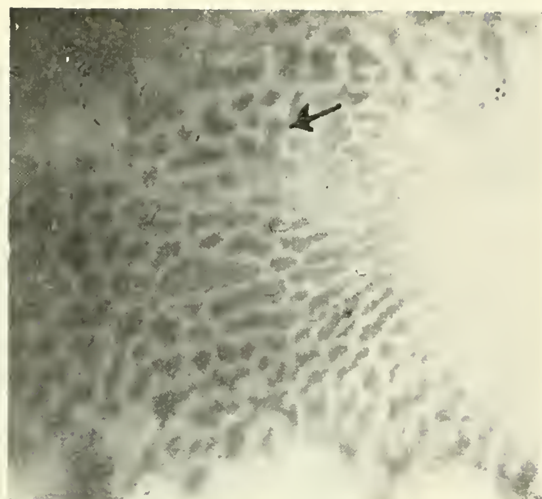


Fig. 370. — Aria vasculară fără circulație, din a cincea zi de incubație. Se văd fundurile de sac.

Fig. 369. — Aria vasculară dezvoltată după întreruperea legăturii cu inima in a doua zi de incubație. Aspect din a șasea zi de incubație. Reacția benzidinei.

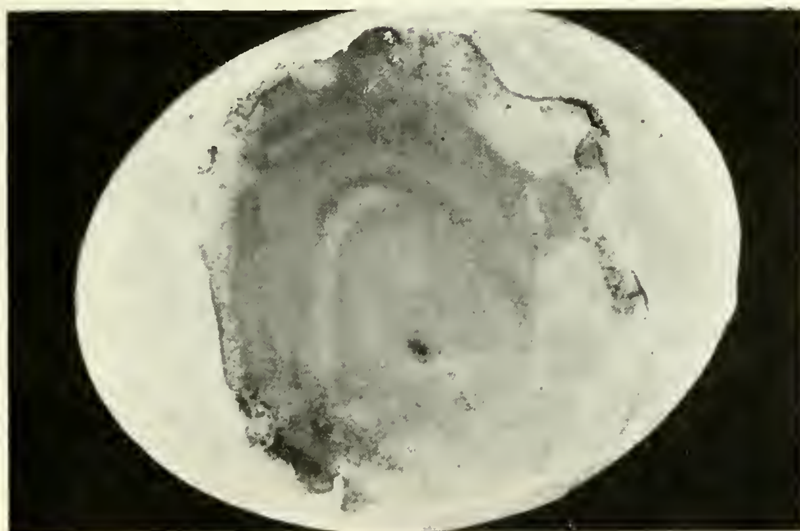


Fig. 371. — Aria vasculară fără circulație, după 6 zile de incubație (embrion distrus în a doua zi de incubație). Zone concentrice plexiforme de vase sinusoide. Chist hematic central.

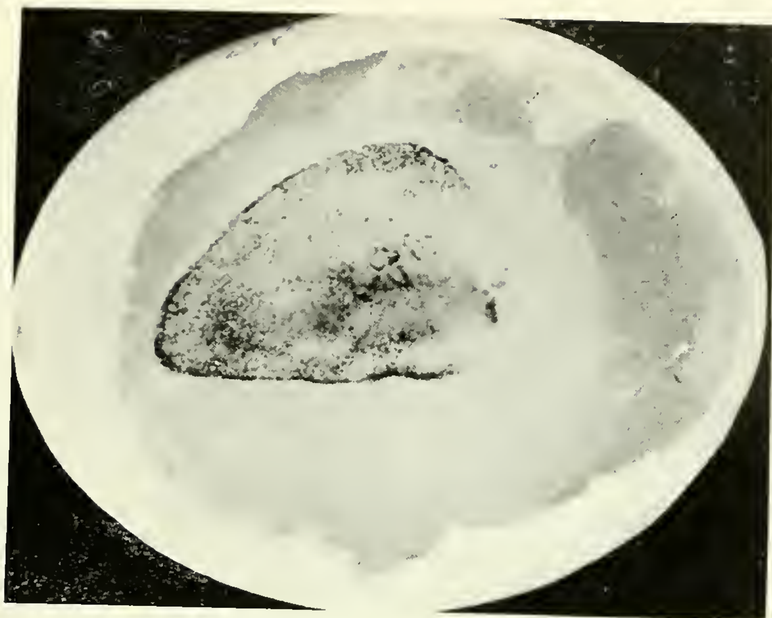


Fig. 372. — Arie vasculară fără circulație, la 6 zile de incubație. Configurația generală.

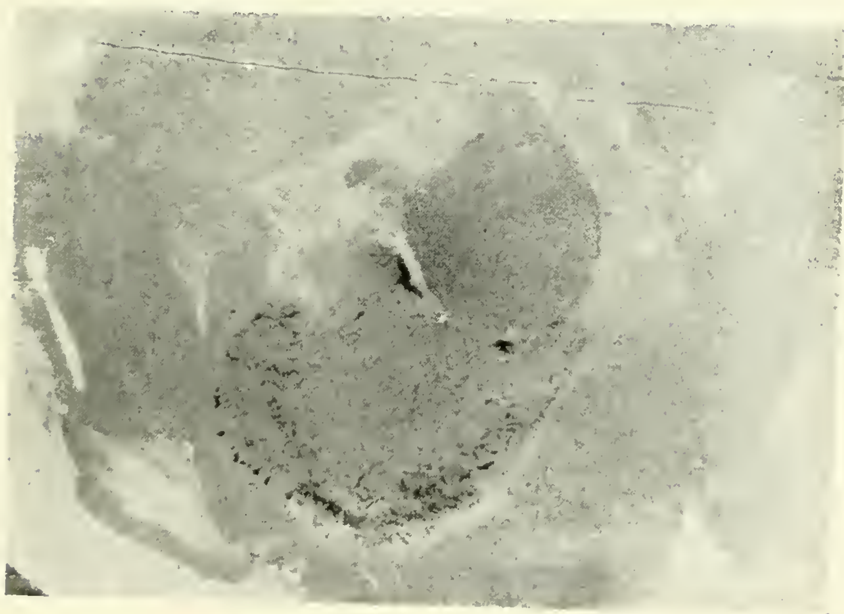


Fig. 373. — Formarea ariei vasculare la două zile după excizia embrionului, executată în prima zi de incubație. Aria s-a dezvoltat excentric.



Fig. 374. — Aria vasculară fără circulaţie, vitelus, endodermul vitelin cu globule viteline intracelulare şi un vas care conţine eritrocite diferenţiate, la 7 zile de incubaţie. Nu s-au format cutele viteline de „scufundare”.

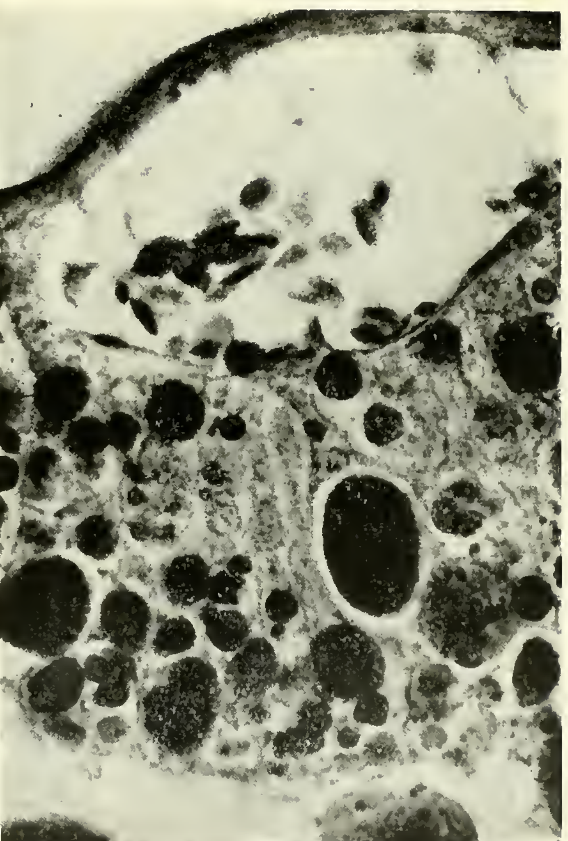


Fig. 375. — Amănunt din figura 374. Vasul cu eritrocite diferenţiate, celulele endodermului vitelin, cu globule viteline intracelulare.

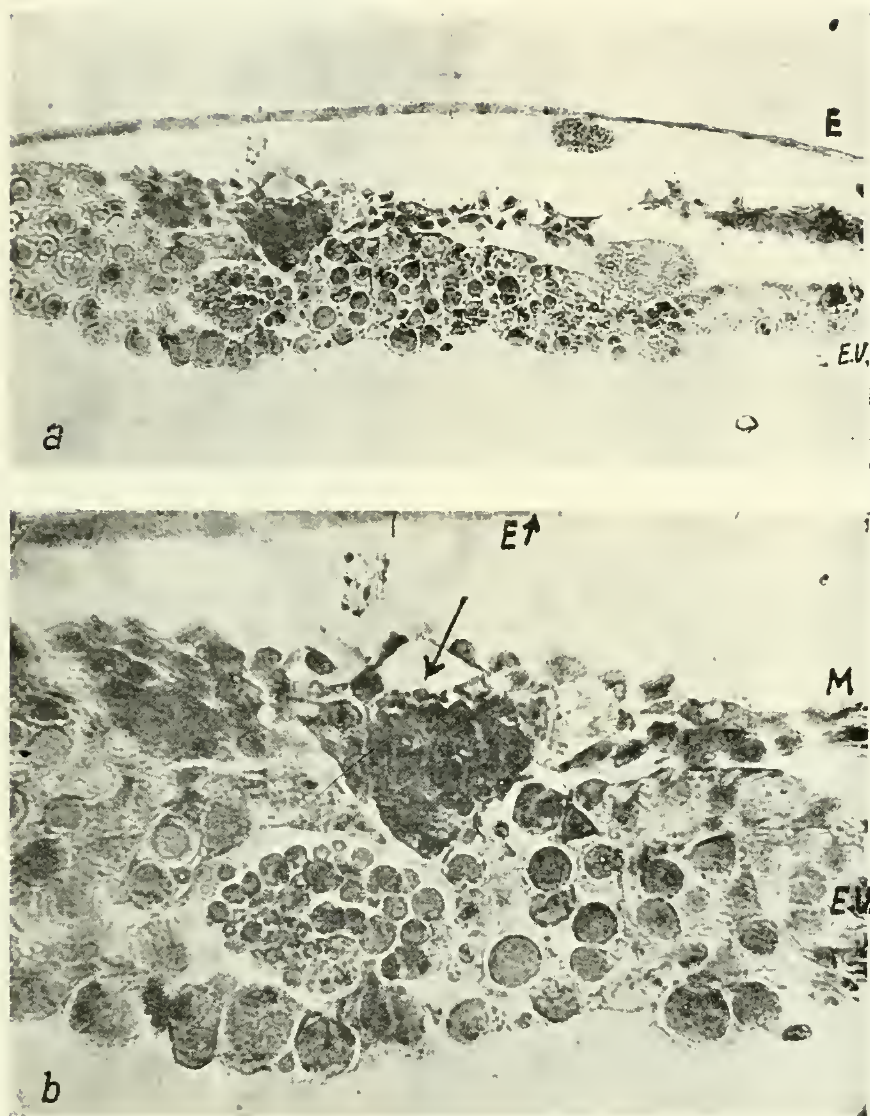
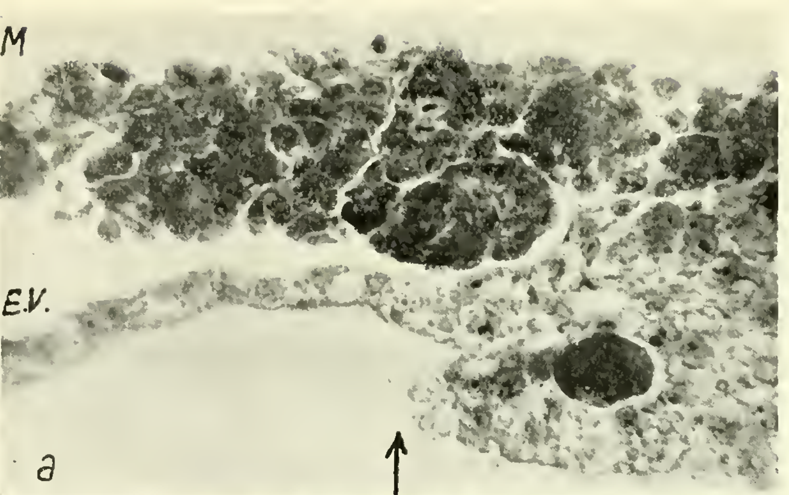
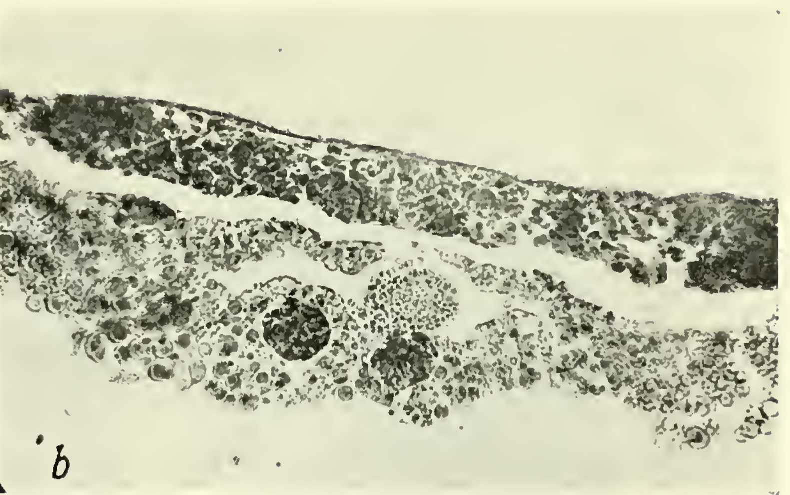


Fig. 376. — Secțiuni prin blastodermul embrionului după 24 de ore de incubație. Imagini în contrast de fază. *a* — Ectoderm; *M* — Mezoderm, cu insule sanguine (Wolff și Pander); *E. V.*, endodermul vitelin cu globule viteline și „singranule" (după denumirea lui O. B. L e p e ș i n s k a i a) *b* — insula sanguină în cuprinsul mezodermului (*M*); *E. V.*, endodermul vitelin în faza de sincițiu, conținînd globule viteline. În vecinătatea insulei sanguine (↓) se găsește un „singranul".





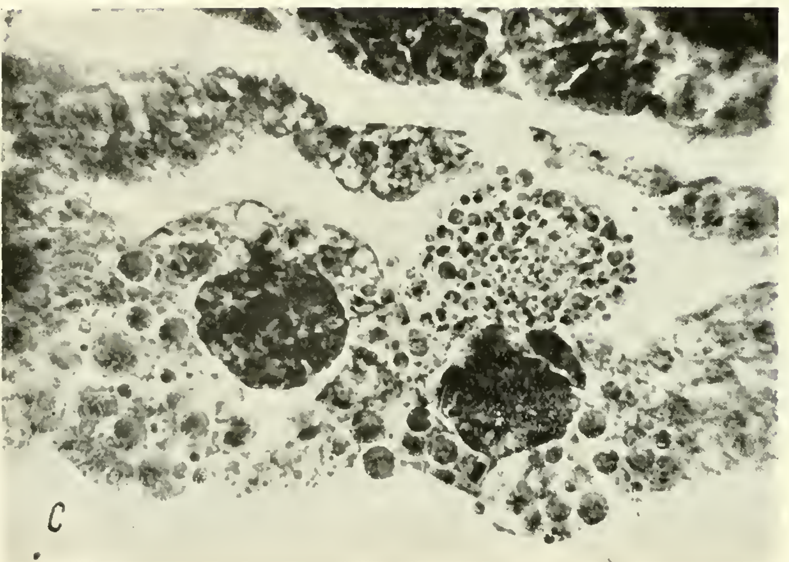


Fig. 377. — Embrion de găină. Secţiune prin aria vasculară la 24 de ore de incubaţie. *a* — *M*, mezoderm cu insule sanguine Wolff — Pander; *E. V.*, endodermul vitelin; (↑) = hotarul ariei opace, cadrul vitelin. Se remarcă o insulă sanguină în plin endoderm. *b* — două insule sanguine în plin endoderm vitelin sinciţial, lîngă un singranul, gata să pătrundă în mezoderm. Deasupra, mezodermul cu ţesut hematopoietic. *c* — detaliu.

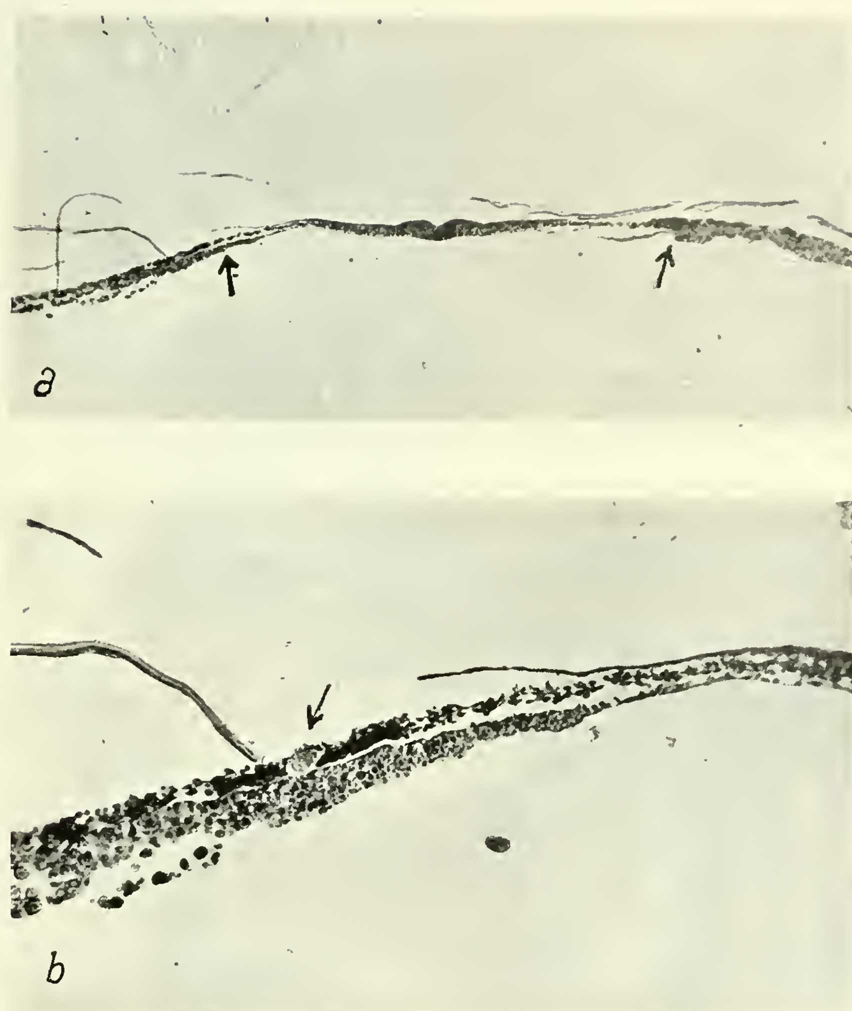


Fig. 378. — Embrion de găină. Secţiuni prin placa embrionară de 24 de ore de incubaţie. *a* — la mijloc se vede aria embrionară cu jgheabul primitiv, ecto-mezo- şi endodermul. Lateral se vede aria pelucida. La (↓) hotarul ariei opace ; *b* — partea stîngă a preparatului din *a* ; la ↓ un „singranul" vitelin a pătruns într-o insulă sanguină.





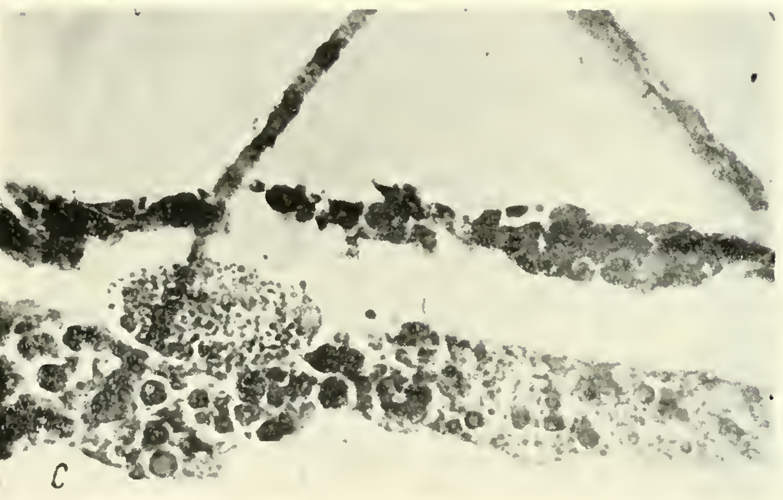


Fig. 379. — *a* — Amănunt din figura 378. *b* — Imagine mărită. *M* — Mezodermul cu insule sanguine de tip Wolff-Pander. *E. V.* — Endodermul vitelin în faza sinciţială. Formarea de singranule. *S* — Singranul înăuntrul insulei sanguine. *c* — Alt aspect din aceeaşi serie; singranul aşezat între mezo- şi endoderm.

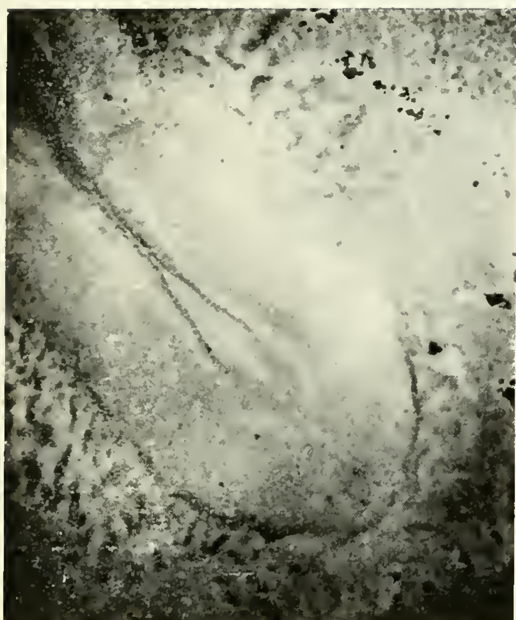


Fig. 380. — Embrion de 30 de ore de incubaţie. Coloraţie vitală — albastru de Nil. Se remarcă elemente viteline intens colorate.

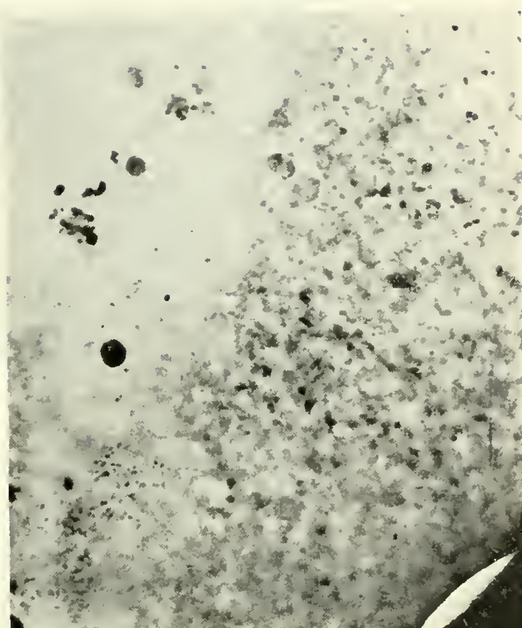


Fig. 381. — Detaliu din figura 380. Se văd elemente viteline din aria pelucida în fragmentare (singranule).

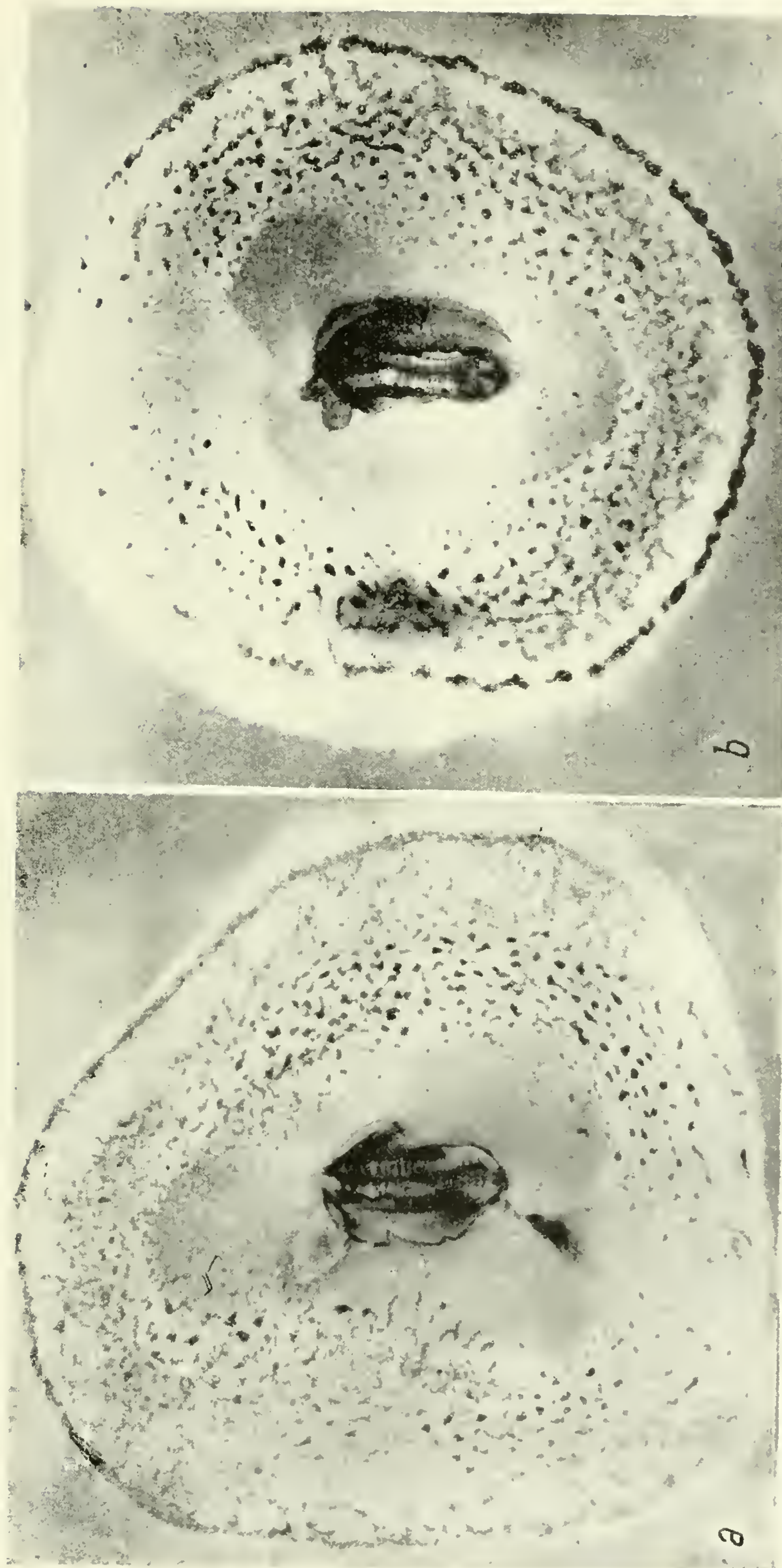


Fig. 382. — *a* și *b* - Arii vasculare fără circulație la un embrion de 4 zile de incubație. Păstrarea corpului embrionar.



Fig. 383. — *a* și *b* — La embrionii din figura 382 se remarcă alungirea transversală a somitelor, continuarea diferențierii lor în direcția caudală și fragmentarea unor somite (↖); de asemenea, dezvoltarea amniosului.

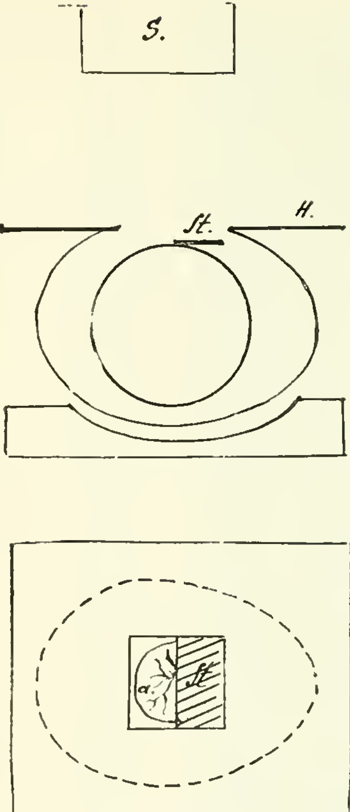


Fig. 384. — Schema pregătirii oului pentru iradiere.

Fig. 385. — Embrion de găină de 2 zile de incubație, iradiat la 36 de ore. Reacția benzidinei (la 12 ore după iradiere). Jumătatea iradiată a ariei vasculare a rămas în urmă ca dezvoltare. *a* — Embrionul normal de control. *b* — Embrionul iradiat.



Fig. 386. — Iradierea sectorului extern al jumătății stîngi a ariei vasculare la 48 de ore de incubație. Aspectul ariei vasculare la 72 de ore de incubație. Sectorul iradiat este necrotic, liniar delimitat. A început reorganizarea rețelei vasculare.



Fig. 387. — Iradierea jumătăţii drepte a ariei vasculare la 48 de ore de incubaţie. Aspectul ariei vasculare la 48 de ore după iradiere. Dispariţia aproape completă a jumătăţii iradiate a ariei vasculare. Poziţia excentrică a embrionului; sinus marginal neoformat în partea dreaptă.

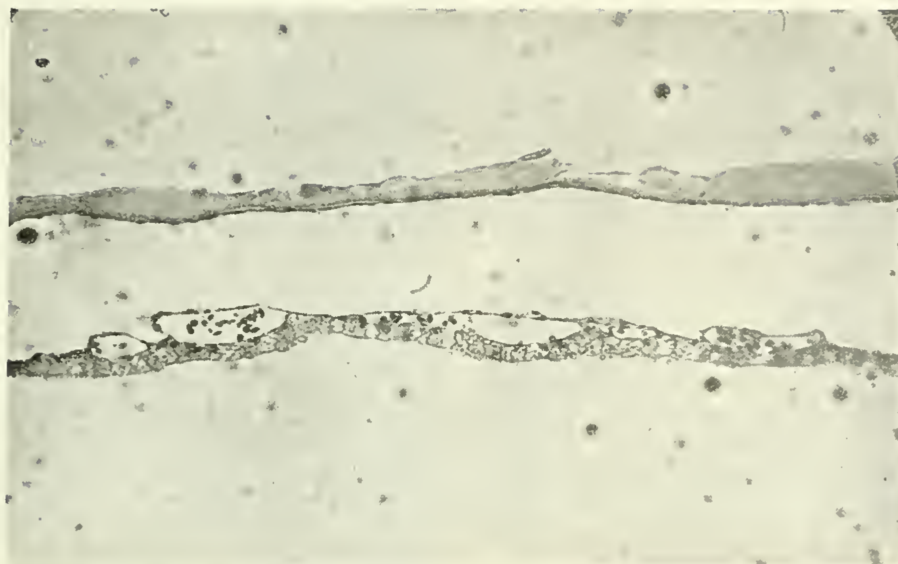


Fig. 388. — Secţiune prin partea neiradiată a ariei vasculare la 72 de ore de incubaţie. Vase viteline normale, cu eritrocite.

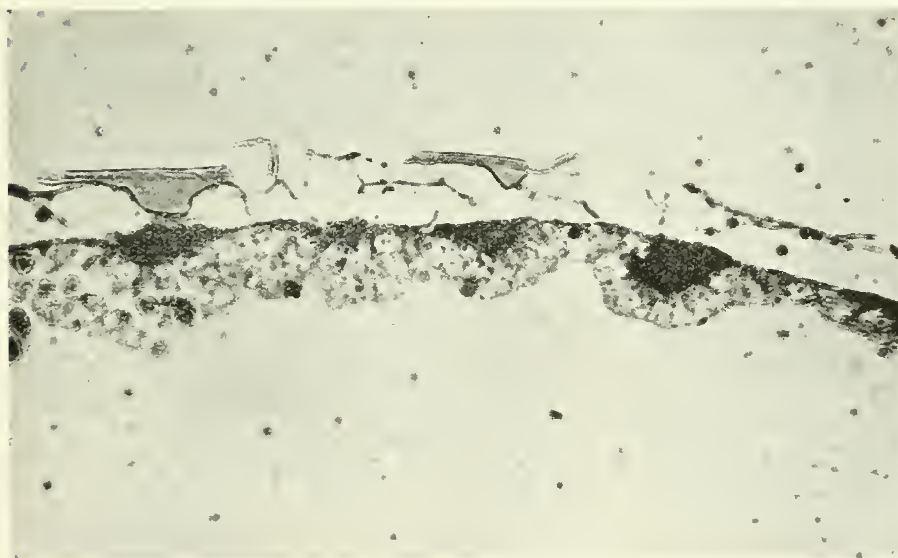
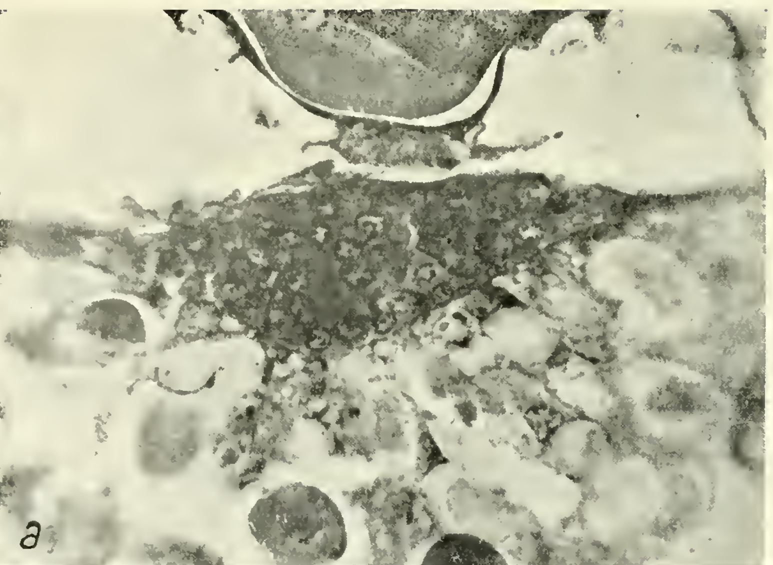
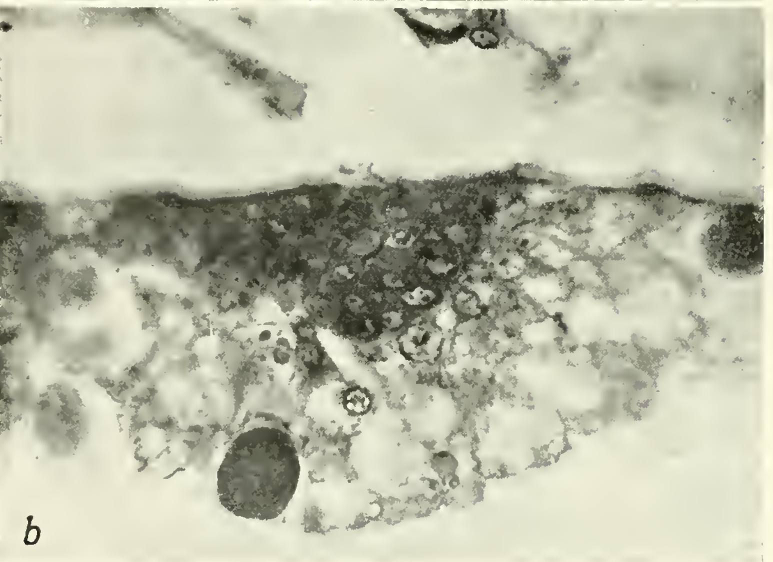


Fig. 389. — Secţiune prin zona ariei vasculare adiacentă zonei iradiate. Acelaşi embrion ca în figura 388. Se remarcă prezenţa de insule sanguine compacte (de tip Wolff-Pander) Nu se găsesc vase sanguine.





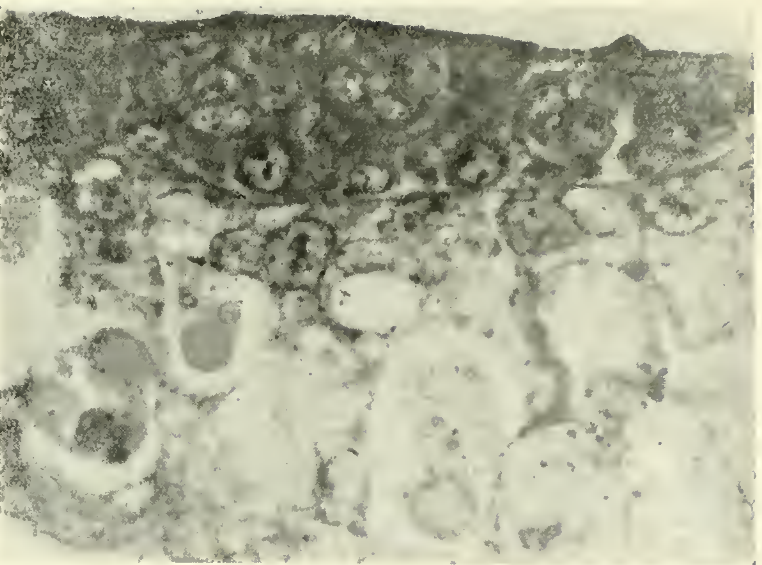


Fig. 391. — Detaliu mărit din figura 389. Imersie. Contrast de fază. Celulele insulei sanguine, nucleii endodermului vitelin. Aspectul sferulelor viteline din celulele endodermului.

Fig. 390. — Detaliu mărit din figura 389. *a* — Absența mitozelor în celulele insulei. Endodermul vitelin cu globule de vitelus. Imagine în contrast de fază. În *b* se văd nucleii endodermului vitelin.

CERCETĂRI ASUPRA CIRCULAŢIEI ALANTOIDIENE LA EMBRIONUL DE GĂINĂ

Vezicula alantoidiană apare la embrionul de găină în a doua zi de incubaţie, ca o evaginaţie a intestinului caudal, a părţii lui cloacale. În a patra zi de incubaţie ea devine vizibilă, proeminînd în afara corpului embrionar în dreptul membrelor inferioare. Pînă în a cincea zi, alantoida este o veziculă destinsă de lichid ; pe măsură însă ce creşte şi se întinde pe suprafaţa ariei vasculare şi a amniosului, ea se turteşte, pierde aspectul de veziculă, păstrîndu-şi totuşi lumenul —„ spaţiul alantoidian" —, care rămîne în legătură cu ureterele primitive şi apoi cu cele definitive.

Alantoida este un organ care joacă un rol deosebit de important în timpul ontogenezei embrionare la păsări. Ca organ cenogenetic ea este proprie numai ontogenezei embrionare.

În cavitatea veziculei alantoidiene se vor vărsa produsele de excreţie ale mezo- şi metanefrosului prin canalele lui Wolff şi ureterele definitive. Unele substanţe care se află în cavitatea alantoidiană se vor resorbi. Însă funcţia principală a acestui organ embrionar constă în adaptarea lui la schimburile gazoase, prin care se absoarbe oxigenul atmosferic pătruns prin porii cojii şi membrana papiracee pînă la nivelul vaselor alantoidiene şi se elimină bioxidul de carbon. Astfel, alantoida devine, începînd cu a opta zi de incubaţie, organul respirator principal al embrionului. Bioxidul de carbon care se elimină la nivelul vaselor alantoidiene serveşte la mobilizarea depozitelor de calciu din coajă, necesare corpului embrionar în creştere.

Vezicula alantoidiană, acoperind din ce în ce mai mult amniosul şi sacul vitelin, fereşte de evaporare apa trecută din albuş în sacul vitelin. Pe lîngă toate aceste funcţii esenţiale, epiteliul corial al membranei corion-alantoidiene, ca primul strat viu (sau cel mai periferic strat viu), care vine în contact cu agenţii exogeni pătrunşi prin membrana papiracee, a căpătat o reactivitate deosebită.

La toate funcţiile amintite ale corion-alantoidei, vascularizaţia ei — circulaţia alantoidiană—joacă un rol foarte important. Studiul circulaţiei alantoidiene se impune însă pe lîngă aceasta şi prin faptul că alantoida a devenit, în ultimii 50 de ani, obiectul unui număr foarte mare de cercetări din cauza condiţiilor prielnice pe care le oferă implantărilor, respectiv interplantărilor, culturilor de virus etc., pentru care comportarea epiteliului, a vaselor şi a mezenchimului alantoidian sînt de cea mai mare importanţă.

Împreună cu B. L i t v a c am studiat dispoziţia reţelei vasculare alantoidiene din punctul de vedere al adaptării ei la funcţia respiratoare. S-a lucrat pe embrioni de rasă Leghorn. Ne-am folosit de tehnici histologice, secţiuni în serie ale membranei alantoidiene la diferite vîrste fixate în Susa. Am dat importanţa principală observaţiilor vitale şi injecţiilor de evidenţiere cu tuş ale reţelei vasculare alantoidiene. Observaţiile vitale s-au executat pe ouă prevăzute cu o fereastră tăiată în coajă, în a doua zi de incubaţie. Suprafaţa alantoidei s-a observat cu ajutorul lupei binoculare sau cu microscopul Ultropac. În acest scop, oul este introdus într-un microtermostat, care asigură condiţiile supravieţuirii embrionului şi în acelaşi timp condiţiile de observaţie microscopică a circulaţiei alantoidiene.

Vasele alantoidiene au fost observate pe viu şi prin mirajul oului, prin membrana papiracee transparentizată cu ulei de parafină.

Injecţia cu tuş a vaselor alantoidiene este posibilă începînd cu a noua zi de incubaţie şi se execută cu un capilar de sticlă prin membrana papiracee transparentizată.

Tușul pătrunde în venă, iar de acolo se injectează întregul sistem vascular al corpului embrionar; după aceasta începe pătrunderea tușului în arterele ombilicale și arterele alantoidiene. În felul acesta se obține de obicei o bună injecție a arterelor alantoidiene și o mai slabă umplere a venelor.

De o importanță deosebită este raportul foarte intim dintre rețeaua vasculară și epiteliul corial. Celulele epiteliale se mulează pe circumferința capilarelor, acoperindu-le uneori aproape în întregime, insinuîndu-se deci pînă sub fața profundă a trunchiului capilar. În felul acesta, pe secțiuni, căpătăm impresia unei poziții intraepiteliale a capilarelor care amintesc plămînul de broască.

Rețeaua capilară „intraepitelială" este alimentată de trunchiuri arteriale și își varsă sîngele în trunchiuri venoase (ambele) situate în grosimea mezenchimului a membranei corion-alantoidiene. Din aceste trunchiuri de distribuire se ridică vasele de legătură înspre rețeaua capilară superficială subepitelială. Întreg dispozitivul vascular al corion-alantoidei ocupă deci trei planuri diferite (fig. 392, 393, 394, 395, 396, 397 și 398).

1) stratul mijlociu al alantoidei, în care se află trunchiurile de distribuție arteriale principale, și colectoarele venoase principale;

2) deasupra lor, planul vaselor de legătură cu rețeaua capilară și, în sfîrșit,

3) rețeaua capilară propriu-zisă. Această rețea microreticulară este dezvoltată numai în stratul corial al membranei, alantoidiene, în contact cu membrana papiracee. Fața membranei corion-alantoidei înspre cavitatea alantoidiană nu posedă o rețea capilară respiratoare. Peretele profund al alantoidei, în contact cu amniosul și sacul vitelin, nu prezintă decît o rețea vasculară macroreticulară, care pare să joace un rol în nutriția membranei amniotice, ea însăși avasculară.

Deosebit de interesant este tipul de ramificare al vaselor de distribuție și de colectare din grosimea membranei corion-alantoidei. Ca principiu de structură, el amintește vascularizația lobulului hepatic, proiectat în plan. Fiecare trunchi arterial dă ramuri de prim ordin, paralele între ele, care se desprind din trunchiul principal sub un unghi de 80—60° (mai ales la embrionii de 9 zile de incubație). Aceste ramuri de prim ordin dau ramuri de-al doilea ordin cu aceeași dispoziție. Ramurile de-al doilea ordin constituie trunchiurile de legătură, mai sus amintite, care alimentează rețeaua respiratoare superficială. Colectoarele au aceeași dispoziție ca și rețeaua arterială de distribuție. În felul acesta, fiecare ramură arterială de prim ordin se află între două ramuri venoase de prim ordin, fiecare ramură arterială de-al doilea ordin, între două ramuri venoase de al doilea ordin și invers.

Fiecare venulă deci, împreună cu cele două arteriole între care se găsește, este comparabilă din punctul de vedere al tipului de ramificație vasculară cu vena centrolobulară, iar fiecare arteră, cu venele portale ale lobulului hepatic.

Dispozitivul permite păstrarea unei anumite lungimi optime a traiectului capilar funcțional eficient, care, în mod vădit, este în legătură cu viteza de parcurgere și capacitatea de hematoză a eritrocitului.

Se vădește aici o structură funcțională oglindind cei trei factori: viteza de circulație, puterea de absorbție a oxigenului și lungimea optimă a traiectului capilar, iar structura descrisă reprezintă folosirea optimă a spațiului în acest sens.

CERCETĂRI ASUPRA MECANISMULUI DE FORMARE A LICHIDULUI SUBEMBRIONAR

Cercetările privitoare la mecanismul formării lichidului subembrionar, sau *plasmă nouă*, sînt relativ puține la număr.

În trecut, cercetătorii și-au îndreptat atenția mai mult asupra dezvoltării embrionului însuși, neglijînd mai mult sau mai puțin restul complexului embrionar. În realitate, însă, între embrion și anexele sale, între acestea și ambianța în care se desfășoară incubarea oului, există o strînsă interacțiune (complexul embrionar).

Studiul factorilor care acționează în sînul complexului embrionar și cunoașterea interacțiunilor lor sînt nu numai necesare pentru înțelegerea proceselor de dezvoltare; acest studiu este menit să deschidă posibilități în vederea dirijării ontogenezei. Din punct de vedere practic, ovicultura, îndeosebi tehnica clocitului artificial, a beneficiat mult de cunoașterea acestor factori.

Un fenomen important care, în decurs de 2—3 zile, schimbă fundamental raporturile dintre albuș și gălbenuș, constă în formarea și acumularea lichidului subembrionar. Formarea acestui lichid începe din primele ore de incubație și ajunge la un maxim de intensitate între a treia și a opta zi. Fenomenele care se petrec în vitelus la oul nefecundat și în primele ore după fecundație, în regiunea subcicatriculară și chiar la mare distanță de ea, pe suprafața gălbenușului, imediat sub membrana vitelină, au constituit obiectul unui studiu foarte amănunțit făcut de V. D. Mîrza și I. Pop. Autorii au descris viteloliza subcicatriculară și „zone periferice de lize globulare", la începutul formării lichidului subembrionar.

Împreună cu S. Elias, B. Litvac, G. Oțetea, am studiat perioada — începînd cu a treia zi de incubație — în care procesul capătă o deosebită intensitate.

În acest scop am efectuat trei grupe de experiențe.

Pe de o parte, ne-am propus să verificăm, pe cale experimentală, unele date din literatură privind raporturile cantitative dintre albuș, gălbenuș și lichidul subembrionar în diferitele etape ale dezvoltării și să aducem unele completări acestor date.

În alte experiențe am căutat să demonstrăm proveniența apei din lichidul subembrionar din albuș.

În sfîrșit, printr-o ultimă serie de experiențe am căutat să modificăm procesul de formare a acestui lichid.

Datele din literatură privitoare la variația în greutate a albușului, gălbenușului și lichidului subembrionar în decursul incubației nu sînt suficient de concordante sau complete (Fangauf descrie raporturile începînd din a șasea zi de incubație). Cercetările noastre în legătură cu această problemă le-am efectuat pe ouă de primăvară și vară de rasă Leghorn, în greutate medie de circa 60 g, făcînd determinări pe fiecare zi de incubație.

Deoarece izolarea lichidului subembrionar prezintă dificultăți tehnice, am folosit trei metode diferite, pentru a evita cît mai mult erorile. Prima metodă constă în separarea albușului de gălbenuș (împreună cu lichidul subembrionar) și cîntărirea acestor componente. Graficul din fig. 399 arată variația albușului față de gălbenuș între a treia și a șasea zi de incubație. A doua metodă constă în extragerea cît mai completă cu seringa, a lichidului subembrionar. Graficul din fig. 400 arată variația lichidului subembrionar

de la a treia la a opta zi. A treia metodă (F a n g a u f, folosită și de R a g o z i n a) constă în fierberea oului timp de cîteva minute în apă și determinarea componenților. În aceste condiții albușul și vitelusul nelichefiat coagulează și pot fi separate. Lichidul subembrionar rămîne în stare lichidă, prezentînd doar un precipitat brînzos alcătuit din proteine. Pe fig. 400 și 401 sînt reprezentate aceste date experimentale.

Presupunînd că pierderea în greutate a albușului se regăsește practic aproape total în gălbenuș sub formă de lichid subembrionar — micile cantități rezultate din viteloliza inițială, nu mai contează aici, luînd în considerare și pierderea prin evaporare care este în medie de 0,5 g pe zi —, se poate calcula cantitatea acestui lichid, respectiv variația lui în perioada de la prima la a șaptea zi. Din figura 400 rezultă o evidentă concordanță între valoarea lichidului subembrionar calculată și cea determinată prin diferitele metode.

Prin aceste experiențe am verificat faptul cunoscut că principala masă a lichidului subembrionar provine din albuș. Procesul prezintă un maximum de intensitate în jurul celei de a patra zile de incubație. Transferul se oprește în a șasea zi, cînd se acumulează 17 ± 2 ml de lichid subembrionar. După această perioadă începe o scădere a lichidului subembrionar pînă la resorbția totală în aproximativ a opta — a zecea zi de incubație (R a g o z i n a). Albușul scade foarte mult în greutate, de la circa 33 pînă la circa 14 g, căpătînd o consistență gelatinoasă.

Determinări de pH. Se știe că la oul neincubat există o diferență între pH-ul albușului și gălbenușului (P e r o v, I. G r o s s f e l d, N e e d h a m). Astfel, pentru albuș, datele din literatura citată sînt cuprinse între 7,63 și 9,4 iar pentru gălbenuș, între 4,5 și 6,6. După începerea incubației se constată o tendință spre egalare, care se instalează, după N e e d h a m, în a 12-a zi, după P e r o v, în a 11-a zi. Deoarece nu am găsit date suficiente în ceea ce privește variația pH-ului lichidului subembrionar în timp (P e r o v studiază variația din 4 în 4 zile, iar N e e d h a m determină pH-ul în gălbenușul total) am efectuat determinări potențiometrice ale pH-ului albușului, gălbenușului și lichidului subembrionar între a treia și a șaptea zi de incubație. Datele experimentale sînt reprezentate în graficul din figura 402.

Se constată o accentuată scădere a pH-ului albușului, care merge paralel cu formarea lichidului subembrionar; pH-ul lichidului subembrionar se menține între pH-ul albușului și al gălbenușului.

În ceea ce privește al doilea grup de experiențe, am procedat în felul următor: în a doua zi de incubație, ouăle sînt eliberate de coajă și transvazate într-un pahar steril. Transvazarea trebuie făcută în așa fel încît discul embrionar să se găsească la suprafață. Se extrage apoi albușul cît mai complet, cu seringa. Paharul se așază într-un vas mai mare cu capac, care conține apă pentru a asigura umiditatea. Se introduce în incubator. Embrionul pus în astfel de condiții trăiește 2—3 zile, în mod excepțional 5 zile. Formarea lichidului subembrionar este însă aproape complet împiedicată. Aceste experiențe verifică direct faptul că masa principală a lichidului subembrionar provine din albuș.

Al treilea grup de experiențe se referă la factorii procesului de formare a lichidului subembrionar.

Între factorii care influențează procesul de formare a lichidului subembrionar este și diferența de presiune osmotică dintre gălbenuș și albuș. După N e e d h a m, presiunea osmotică este la începutul incubației pentru gălbenuș de — 0,550 °C, iar pentru albuș de —0,450 °C. Dacă se calculează cantitatea de apă care ar trebui să treacă din albuș în gălbenuș pentru a egala această diferență de presiune osmotică, se obține valoarea de 3,06 ml. Se constată însă că pînă la a șasea zi traversează din albuș în gălbenuș o canti-

tate mult mai mare de lichid, pînă la circa 20 ml. Aceste fapte arată că trecerea de lichid din albuş în gălbenuş nu se datoreşte numai diferenţei de presiune osmotică, cu atît mai mult cu cît formarea lichidului subembrionar în cantităţile descrise nu se produce în ouăle nefecundate,cu toate că şi acestea posedă o diferenţă de presiune osmotică.

Totuşi, presiunea osmotică trebuie considerată ca un factor important de influenţă. În experienţele noastre în care am produs o hipotonizare a albuşului prin scoaterea a 2—3 ml de albuş în a doua zi de incubaţie şi înlocuirea acestora cu apă distilată sterilă, se formează o cantitate mai mare de lichid subembrionar (circa 9 ml în a patra zi). Dacă se introduce în albuş o soluţie hipertonică în diferite concentraţii (clorură de sodiu 2—5%), se constată fenomenul invers, adică reducerea cantităţii de lichid subembrionar.

Desigur că în mecanismul de formare a lichidului subembrionar intră şi mulţi alţi factori. Se poate constata astfel că, prin intoxicarea complexului embrionar cu o soluţie de cianură de sodiu sau cu formol, procesul formării lichidului subembrionar se opreşte (S. Elias). Excizia, hipoplazia sau cauterizarea embrionului în a doua zi de incubaţie, cu lăsarea intactă a ariei vasculare şi a membranelor extraembrionare, nu împiedică formarea lichidului subembrionar. În asemenea cazuri, aria vasculară se dezvoltă fără circulaţie (vezi capitolul precedent), ceea ce nu împiedică însă formarea lichidului subembrionar.

Aceste experienţe demonstrează rolul activ al mambranelor extraembrionare în transferul apei din albuş în gălbenuş.

Lichidul provenit din albuş are la rîndul lui, o acţiune dizolvantă asupra vitelusului (O. B. Lepeşinskaia arată că soluţii saline diluate au acţiune dizolvantă asupra globulelor viteline). Un argument important care susţine această afirmaţie este conţinutul relativ bogat în lipide al lichidului subembrionar (pînă la 1—5% în a şaptea zi) în contrast cu cel al albuşului, care conţine doar urme de lipide (maximum 0,05%, Grossfeld). Lipidele din lichidul subembrionar provin din vitelus, care conţine circa 30% (Grosfeld), fiind dizolvate de lichidul provenit din albuş. Datorită acestui proces de dizolvare (viteloliză) care evoluează paralel cu formarea lichidului subembrionar, substanţele lipidice din globulele viteline sînt transformate într-o soluţie lipoprotidică, putînd fi astfel uşor resorbite (graficul din figura 403).

Schimbările profunde care au loc în anexele embrionare în această perioadă creează noi interrelaţii între embrion şi restul complexului embrionar.

Desigur că prin experienţele prezentate nu am evidenţiat decît un număr foarte mic de factori care acţionează în acest proces. Găsirea altor factori care condiţionează formarea lichidului subembrionar ne va preocupa şi pe mai departe.

CERCETĂRI ASUPRA COMPOZIŢIEI LICHIDULUI SUBEMBRIONAR

S. Elias, din colectivul nostru, a întreprins cercetări asupra compoziţiei chimice a lichidului subembrionar, între a patra şi a opta zi de incubaţie, perioadă în care cantitatea lichidului este destul de mare.

În scopul elucidării compoziţiei lichidului subembrionar s-au determinat o serie de constante fizice şi fizico-chimice, şi s-au efectuat analize chimice ale unor grupe de substanţe importante din punct de vedere biochimic. În afara metodelor curente de analiză, au fost efectuate şi cercetări electroforetice şi cromatografice. În cele ce urmează expunem rezultatele la care am ajuns în stadiul actual al cercetărilor.

ASPECT

Lichidul subembrionar proaspăt extras este de obicei tulbure. Prin centrifugare la turație mare se obține un sediment format din globule viteline și eritrocite (acestea din urmă provin din lezarea vaselor sanguine în timpul extracției) și un supernatant ușor opalescent.

Culoarea este de obicei albicioasă sau foarte slab gălbuie, devine apoi din ce în ce mai galbenă. Acest fapt este în concordanță cu creșterea lipidelor între a patra și a opta zi (vezi graficul din figura 403).

Mirosul amintește pe cel al oului fiert. Gustul este ușor sărat.

CONSTANTE FIZICE ȘI FIZICO-CHIMICE

Tabelul nr. 1

Constantele fizice și fizico-chimice ale lichidului subembrionar între a cincea și a șasea z (după S. Elias)

Constanta	Valoarea	Observații
Densitatea	1,0075	la 20 °C
Conținutul în apă	97,15 %	prin uscare la 110–115 °C
Reziduul sec corespunzător	2,85 %	idem
pH	7,7–8	vezi lucrarea citată
Rezistivitatea electrică	75 cm	la 37 °C
Indicele de refracție	1,3376	la 18 °C
Coborîrea punctului de congelare	–0,58–0,60 °C	
Benzi de absorbție	între 410–510 mm	
Tensiunea superficială	48,2 dyn/cm	la 20 °C

ANALIZA CHIMICĂ

Substanțe anorganice. În lichidul subembrionar s-au găsit următorii anioni și cationi: cloruri, fosfați, sulfați, sodiu, potasiu, calciu, amoniu. Dintre acestea s-au dozat în perioada de la a patra la a opta zi de incubație, pe fiecare zi de incubație, clorurile, fosfații și calciul. Clorurile se mențin aproximativ constante la circa 300 mg %, exprimate în clorură de sodiu. Fosfații (fosfat anorganic) cresc de la 1,64 la 2,44 mg% de la a cincea la a opta zi. Calciul se menține în jurul a 4 mg%.

Rezerva alcalină, după metoda van Slyke: 29 volume de CO_2%.

Aciditatea titrabilă (față de fenoeftaleină) exprimată în mililitri de NaOH n/10 pentru 100 ml lichid subembrionar crește de la 2 la 6 ml (de la a patra pînă la a opta zi).

Substanțe organice. a) *Glucide.* Glucoza (metoda Hagedorn - Jensen) scade de la 1,8 la 1,2 g‰ (graficul din figura 404).

b) *Lipide.* Lipidele în lichidul subembrionar există sub formă de *cenapse lipoprotidice.* Cantitatea de lipiide crește de la a patra pînă la a opta zi de la 0,9 la 2,4 % (fig. 403) (extract alcool-eteric). Colesterolul crește de la 150 la 200 mg% (de la a patra la a opta zi).

c) *Protide.* Lichidul subembrionar conține protide, a căror prezență a fost pusă în evidență prin acid tricloracetic, acid sulfosalicilic, acetat de plumb, reactiv Essbach, acetat de uranil, wolframat de sodiu, sulfat de amoniu (soluție saturată), acid azotic, alcool etilic, acetonă, coagulare prin fierbere. Toate aceste reacții sînt intens pozitive.

Analiza cantitativă (metoda gravimetrică) arată că protidele variază între 0,3 și 1,4 %, crescînd de la a patra la a opta zi de incubație (graficul din figura 405).

Electroforeza pe hîrtie cu tampon veronal — medinal (pH = 8,6), cu $\mu = 0{,}15$, curent stabilizat (6 V/cm), arată prezența a patru fracțiuni protidice. Aspectul elfogramelor din lichidul subembrionar se aseamănă foarte mult cu cele din gălbenușul gros, indicînd proveniența protidelor lichidului subembrionar din acesta din urmă.

Cromatografia pe hîrtie (bidimensională) cu sistemul fenol/apă — butanol/acid acetic-apă a unui hidrolizat de protide izolat din lichidul subembrionar prin precipitare cu acetonă la temperatură joasă, a permis punerea în evidență a următorilor aminoacizi[1]) : cistină, cisteină, lizină, acid aspartic, arginină, serină, glicocol, acid glutamic, treonină, histidină, prolină, tirozină, metionină, valină, leucină, alanină, fenilalanină.

d) *Alte substanțe organice.* Lichidul subembrionar conține și *aminoacizi liberi*, puși în evidență în supernatantul tricloracetic prin cromatografie pe hîrtie monodimensională. Se constată prezența unui număr mare de aminoacizi (aceste cercetări sînt încă în curs). Ureea se găsește pînă la a șaptea zi într-o concentrație de 11 —12 mg %, apoi începe să scadă (7,5 mg în a opta zi).

Conținutul în *acid uric* este în jurul valorii de 1 mg %, cu un minimum în a șasea zi (0,75 mg %).

Reacția cu nitroprusiatul de sodiu pentru punerea în evidență a grupărilor SH libere a fost negativă.

Fosforul organic scade de la valoarea de 7,33 la 3,11 mg% în perioada de la a cincea la a șasea zi.

e) *Enzime.* Pînă în prezent au fost studiate : peroxidaze, amilaza, lipaze și proteaze.

Peroxidazele sînt absente în frotiul de lichid subembrionar, cercetate prin reacția benzidinei.

Amilaza, prezentă sub formă de urme în a patra zi, crește începînd cu a șaptea zi de la 4 la 32 de unități convenționale (o unitate convențională = cantitatea de enzimă care hidrolizează 1 ml de soluție de amidon 0,5‰, timp de 30 minute la 37°C, în prezența de clorură de sodiu).

Lipaze, respectiv proteaze, nu au putut fi puse în evidență prin metodele obișnuite simple.

Concluziile pe care le trage S. E l i a s din aceste date pot fi rezumate astfel :

Analiza lichidului subembrionar arată că acesta reprezintă un lichid din punct de vedere biochimic asemănător cu serul sanguin (diluat 1 : 1), mai cu seamă în ceea ce privește prezența și concentrația unor substanțe importante din punct de vedere biochimic.

După cum reiese din acest tablou, există o asemănare marcantă între concentrația acestor substanțe de bază din lichidul subembrionar și plasma sanguină. Diferența principală — conform cercetărilor de pînă acum — constă în conținutul relativ mare în lipide și glucoză și relativ scăzut în protide al lichidului subembrionar față de concentrația acestor componente în ser.

[1]) Reacția a fost efectuată cu ninhidrină.

În legătură cu aceasta trebuie să admitem variația compoziței lichidului subembrionar în timpul incubației ; astfel, lipidele[1]) și protidele cresc, iar glucoza scade. Pe de

Tabelul nr. 2

Compoziția lichidului subembrionar comparată cu compoziția serului sanguin uman, diluat 1 : 1 (după S. Elias)

Compus	Lichid subembrionar	Ser (diluat 1 : 1)
NaCl	300 mg %	300 mg %
Ca	4 mg %	5 mg %
Fosfor anorganic	1,6—2,4 medie 2 mg %	în medie 2 mg %
Rezerva alcalină	29 vol. CO_2%	30 vol. CO_2%
Protide	cca. 1 %	3 %
Lipide	1—1,5 %	0,3 %
Colesterol	150—200 mg %	60 mg %
Glucoză	1,80—1,2‰	50 mg %
Acid uric	cca. 1 mg %	1—2 mg %
Uree	11—12 mg %	în medie 17 mg %
Amilază	prezentă	prezentă
Aminoacizi liberi	prezenți	prezenți
pH	7,7—8	7,4

altă parte, și componenții sîngelui sînt supuși unor variații mari în unele stări fiziologice și în special patologice, compatibile cu viața (de exemplu lipemii sau diabet zaharat). În aceste cazuri, și concentrațiile componenților menționați (în lichid subembrionar, respectiv sînge) sînt foarte apropiate.

Diluția de 1 : 1 a serului la care ne-am raportat este arbitrară, deoarece nu am găsit date asupra compoziției serului embrionului. Cert este însă că atît țesuturile, cît și lichidele biologice în stadiul embrionar au un conținut cu mult mai mare de apă decît în stare matură.

Semnificația procesului de formare a lichidului subembrionar pare a fi următoarea :

Prin dizolvarea vitelusului se formează un lichid complex din punct de vedere biochimic și ușor resorbabil. Materiile prime de bază — albușul și gălbenușul — fiind foarte concentrate, nu pot fi folosite ca atare. Prin interacțiunea lor, declanșată și influențată chiar de dezvoltarea embrionului (și a anexelor), se formează un mediu extern față de corpul embrionului care, după cum am văzut, seamănă mult cu plasma sanguină, deci cu viitorul mediu intern.

În acest proces de dizolvare a gălbenușului acționează fermenți secretați de către țesuturile embrionare, dar viteloliza se datorește și soluției saline care se formează prin transferul de apă de la albuș la gălbenuș. Se știe — lucru pe care de altfel l-am verificat și noi — că atît soluțiile saline, cît și lichidul subembrionar din primele zile dizolvă vitelusul, dînd un lichid clar.

În concluzie putem spune că datorită unor interacțiuni complexe dintre albuș, gălbenuș și embrion se formează un lichid nutritiv care reprezintă forma resorbabilă a substanțelor concentrate din vitelus.

[1]) Acest lucru se explică prin însăși geneza lichidului subembrionar, care se formează în cea mai mare parte prin dizolvarea vitelusului de către apa pătrunsă din albuș (Remotti-Ragozina). Or, vitelusul e foarte bogat în lipide.

BIBLIOGRAFIE

1. Elias S., Litvac B. şi Oţetea G., *Cercetări experimentale asupra mecanismului formării lichidului subembrionar (plasma nouă) la embrionul de găină*, Studii şi cercetări ştiinţ. Acad. R.P.R., Baza Timişoara, 1956, t. III, nr. 3—4.
2. Grossfeld I., *Handbuch der Eierkunde*, Berlin, Springer, 1938, p. 63.
3. Lepeşinskaia O. B., *Geneza celulelor din substanţa vie şi rolul substanţei vii în organism*, Ed. Acad. R.P.R., 1952, p. 123.
4. Menkes B. şi Litvac B., *Cercetări asupra circulaţiei viteline la embrionul de găină*, Bul. ştiinţ, Acad. R.P.R. Secţiunea de ştiinţe medicale, 1953, t. V, nr. 1, p. 149.
5. Mîrza V. D. şi Pop I., *Geneza cavităţii subgerminale la embrionul de găină* în *Lucrările sesiunii ştiinţifice a secţiei de ştiinţe medicale a Academiei R.P.R. din 22—24 ianuarie 1954*, Ed Acad. R.P.R., 1955, p. 607.
6. Needham J., *The Metabolism of the Developing Egg*, Physiol. Rev., 1925, vol. V, nr. 1, p. 58.
7. Perov S. S., *Modificările constantelor fizico-chimice ale plasmelor oului de găină în timpul incubaţiei*, în *Biochimia substanţelor albuminoide*, 1951, p. 206, 215 şi 216.
8. Ragozina M. N., *Roli belkovoi obolociki iaiţa v razvitii ţiplenka*, Trudî Inst. morfol. jivothnîh im. A. N. Severţova, 1951, nr. 12, p. 264.

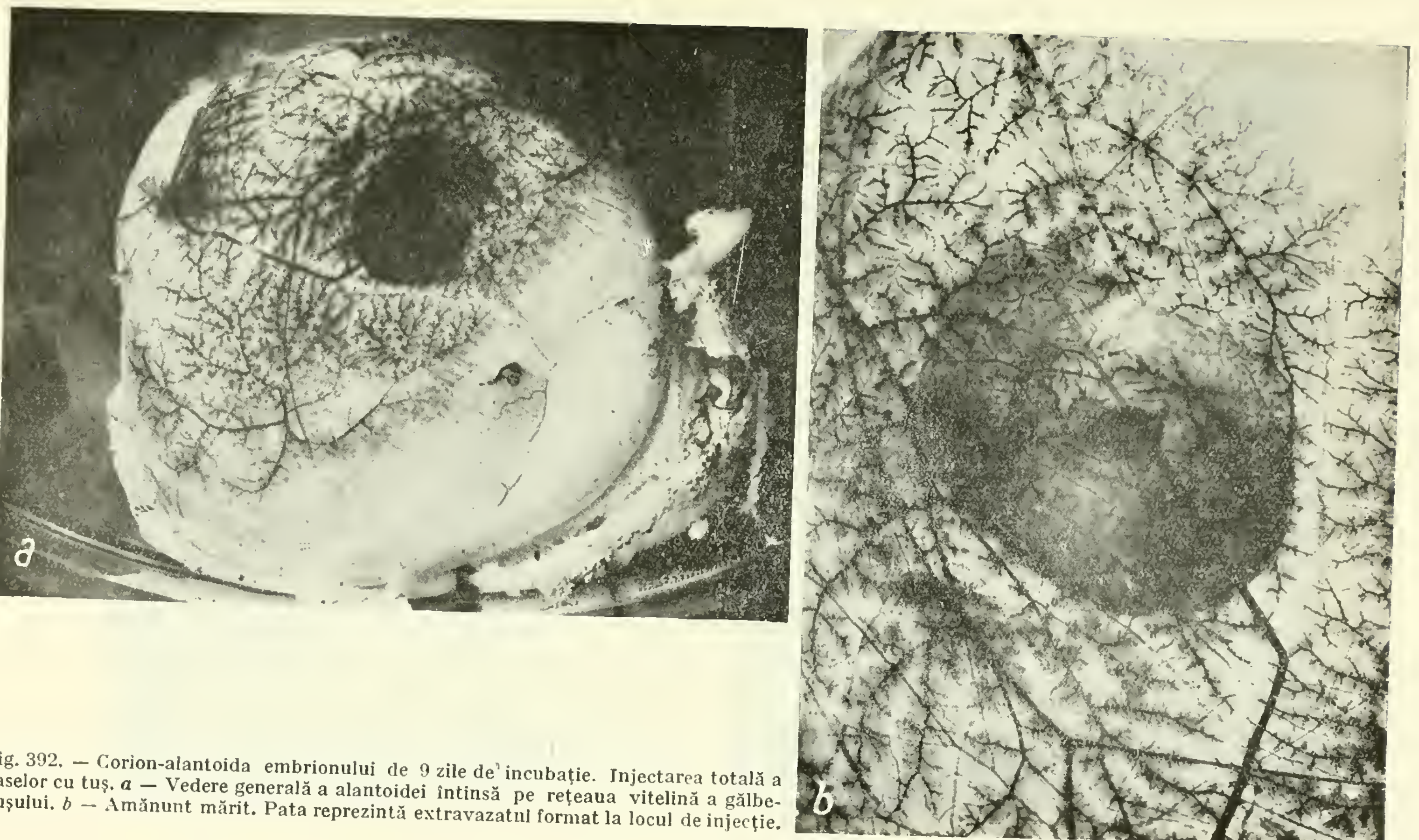


Fig. 392. — Corion-alantoida embrionului de 9 zile de incubaţie. Injectarea totală a vaselor cu tuş. *a* — Vedere generală a alantoidei întinsă pe reţeaua vitelină a gălbenuşului. *b* — Amănunt mărit. Pata reprezintă extravazatul format la locul de injecţie.

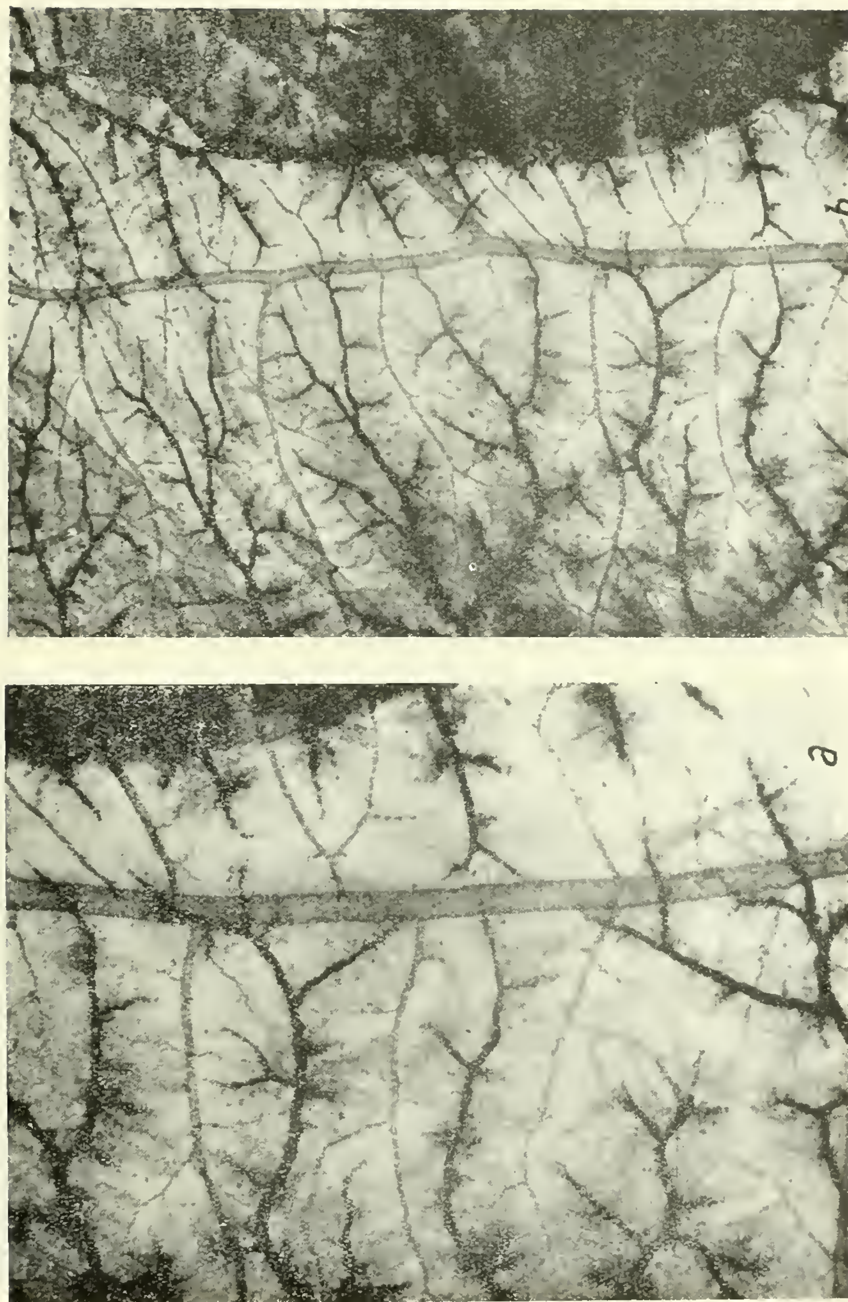


Fig. 393. — *a* și *b* - Injecția cu tuș la embrionul de 9 zile de incubație. Ramificare tipică a arterelor și venelor.

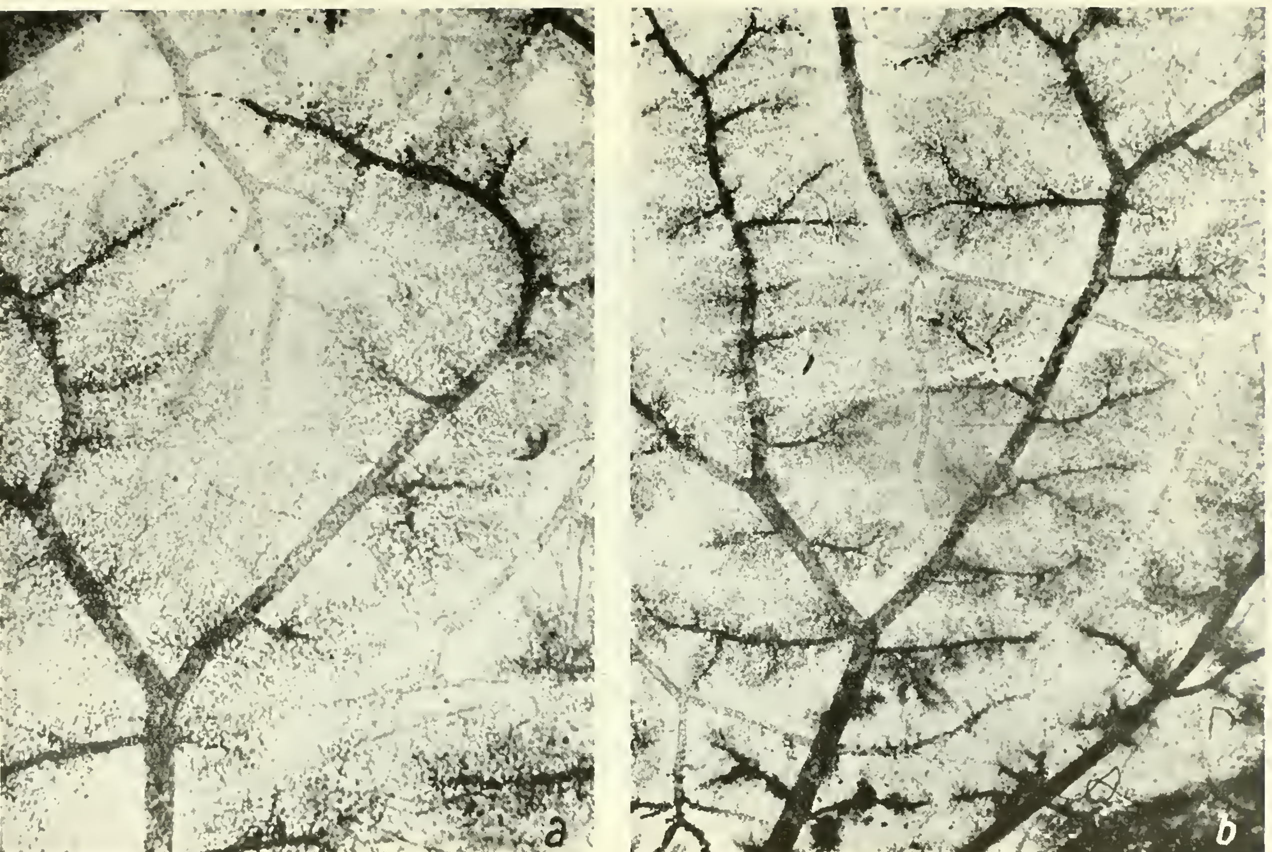


Fig. 391. - *a* și *b* — Injecție cu tuș. Alantoida embrionului de 9 zile de incubație. Arterele apar colorate în negru, iar venele au o nuanță mai deschisă. Evidentierea capilarelor respiratoare.

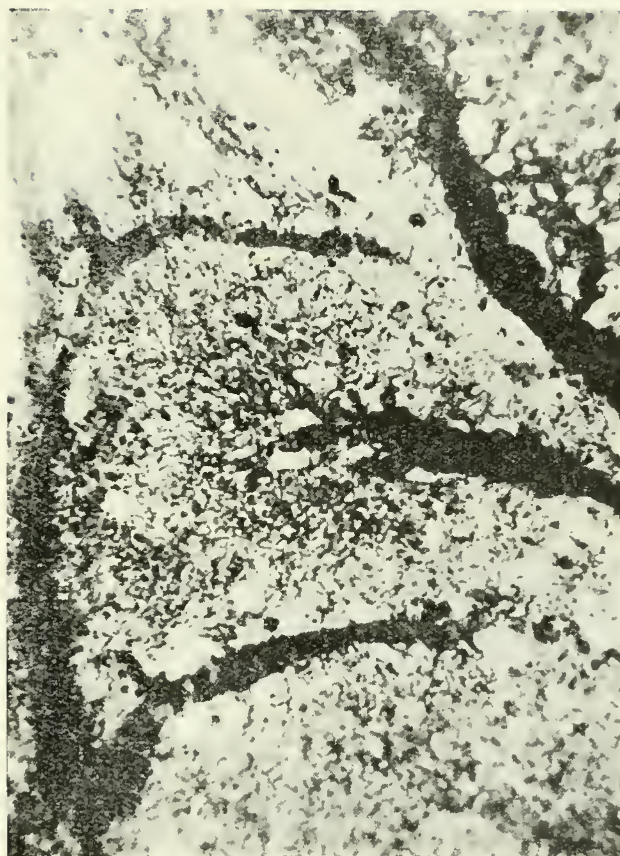


Fig. 395. — Embrion de 9 zile de incubaţie. Injecţie cu tuş. „Lobulul" cu vasele aferente şi eferente. Capilarele respiratoare.

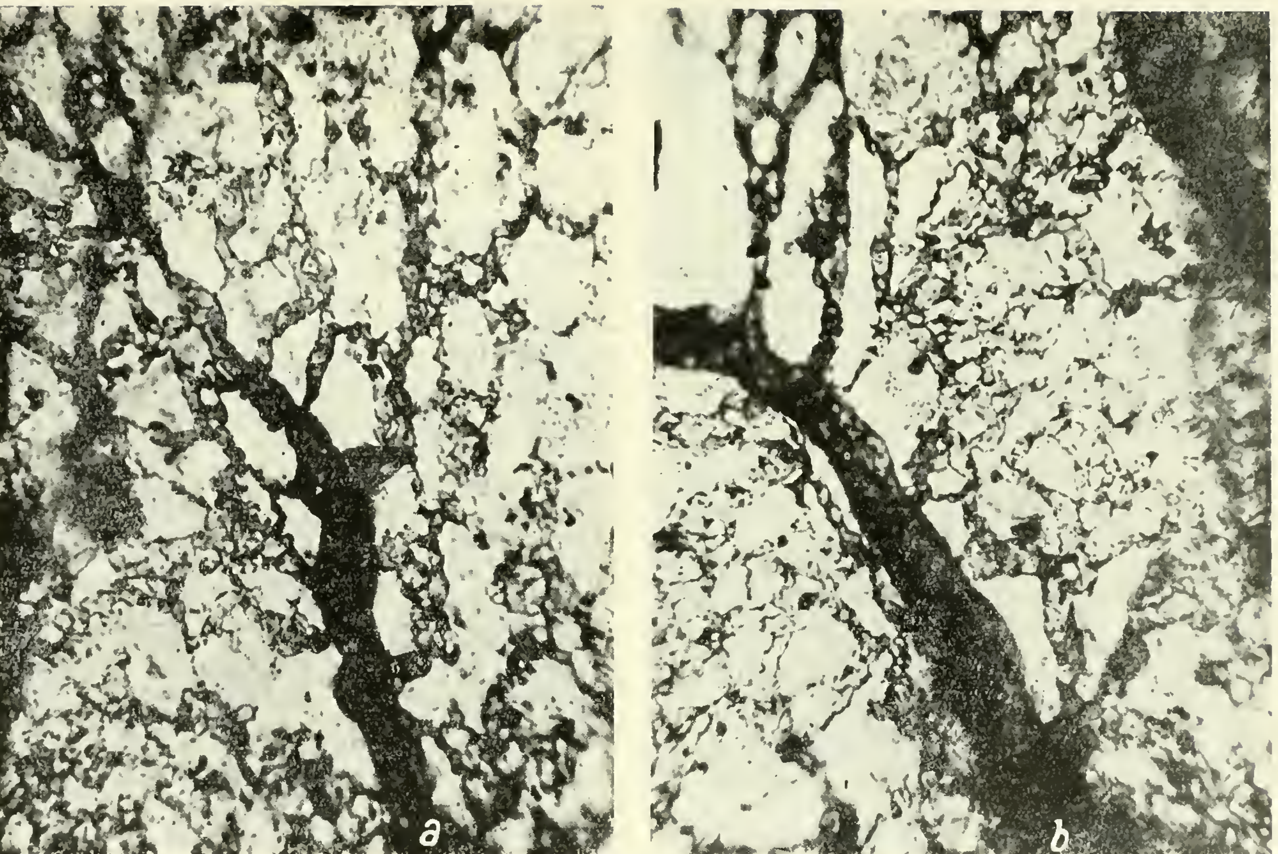


Fig. 396. — *a* și *b* — Corion-alantoida embrionului de 9 zile de incubație. Injecție cu tuș. Capilarele respiratoare. Preparat total. Clarificare glicerină.

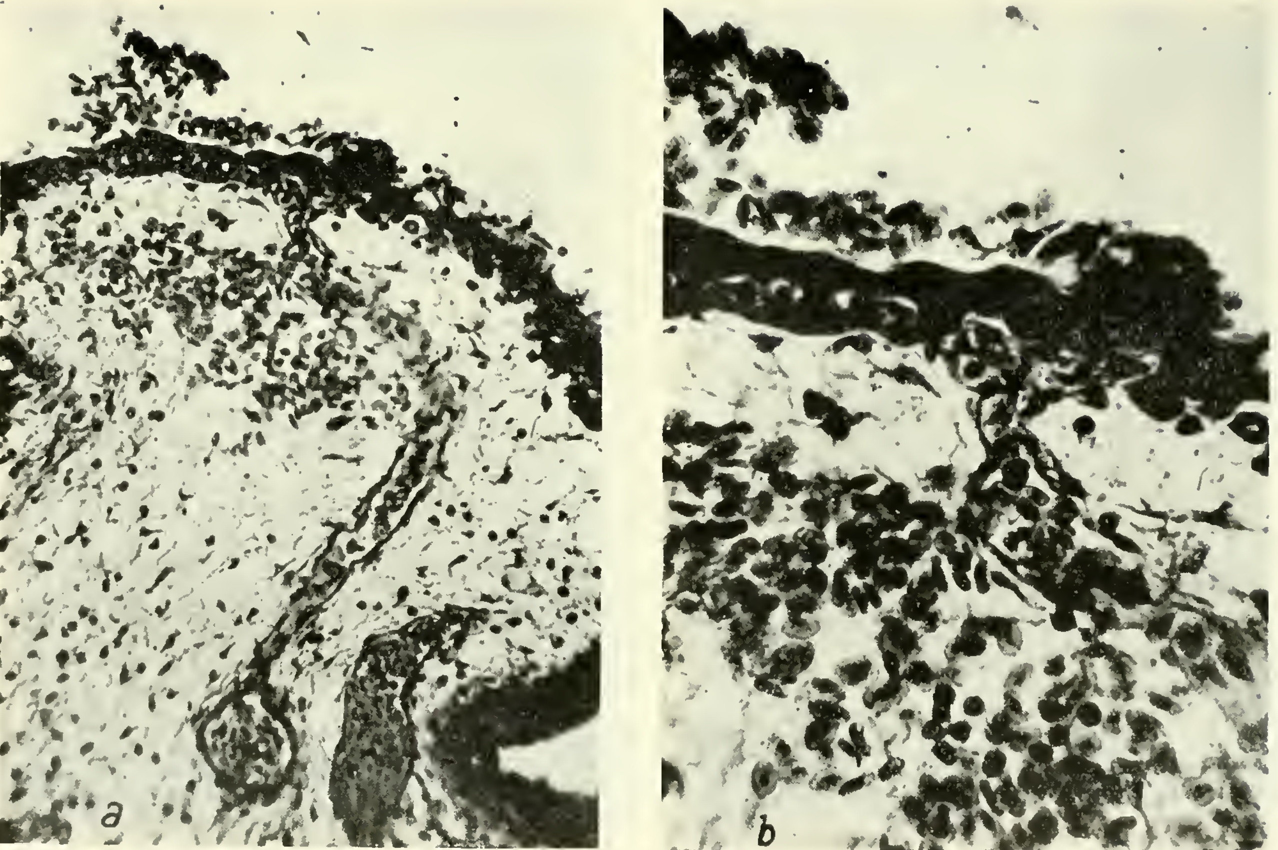


Fig. 397 — *a* și *b* — Corion-alantoida embrionului de 12 zile de incubație. Raportul dintre epiteliu și capilarele respiratoare.

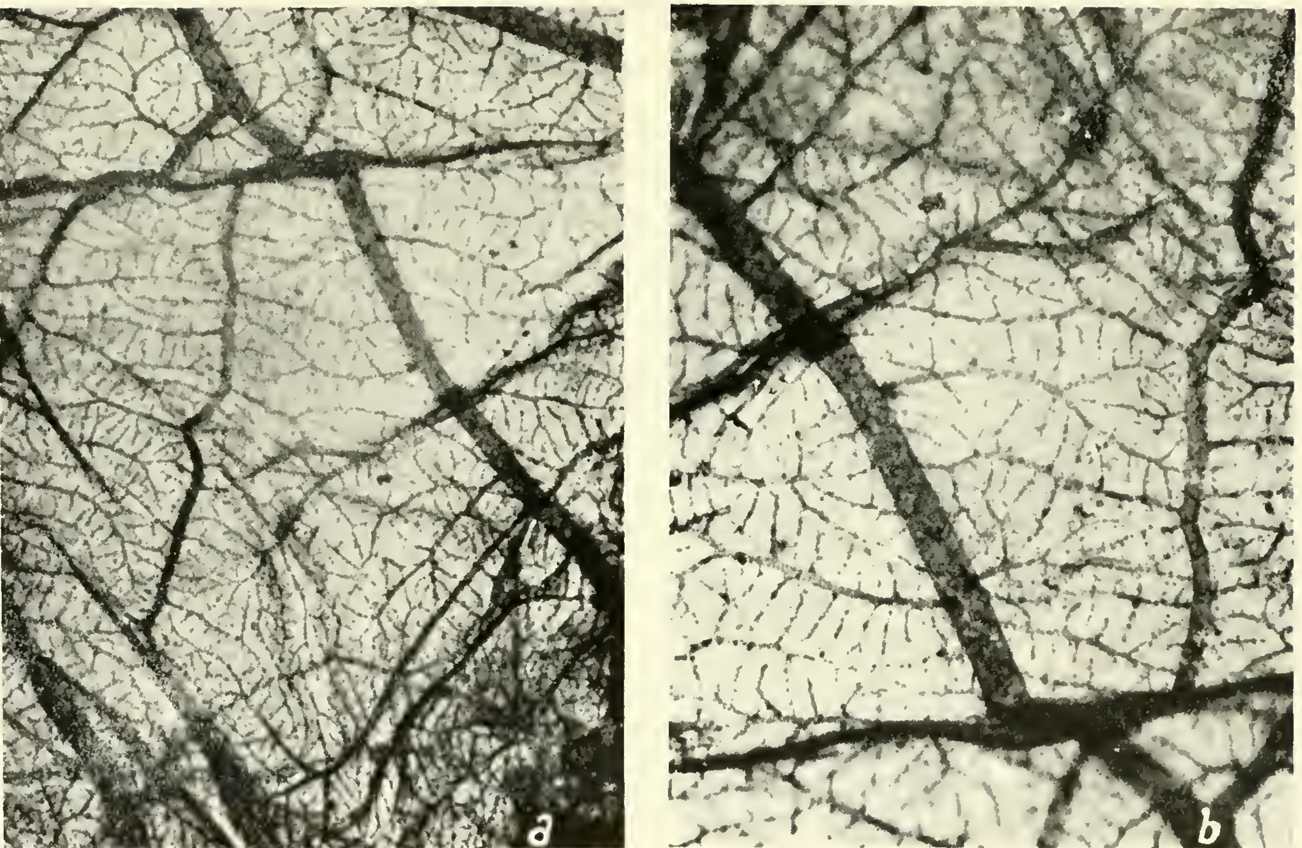


Fig. 398. — *a* și *b* — Injectarea cu tuș a corion-alantoidei embrionului de 14 zile de incubație. Completa dezvoltare a structurii funcționale optime a rețelei vasculare.

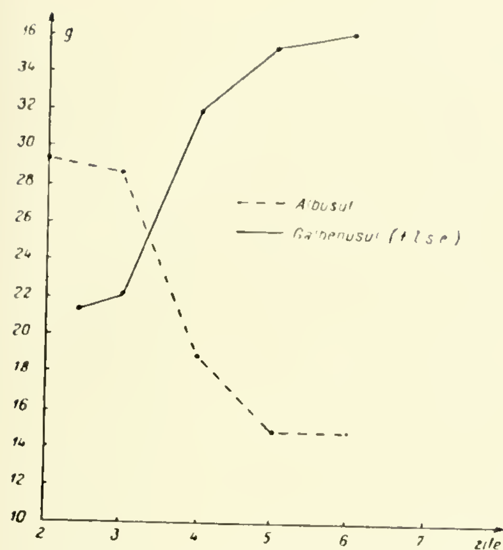


Fig. 399. — Variațiile albușului și gălbenușului împreună cu lichidul subembrionar.

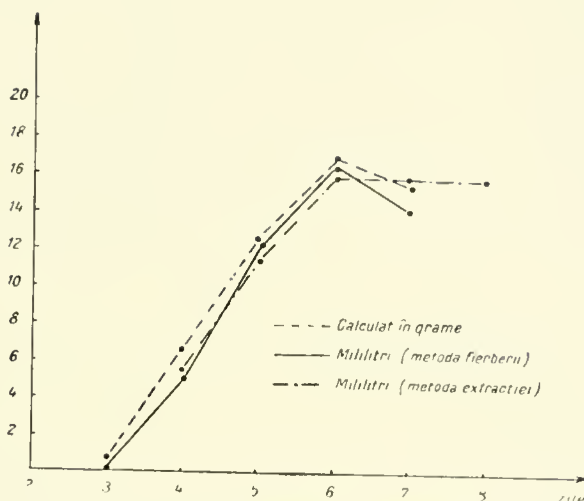


Fig. 400. — Formarea lichidului subembrionar (în timp)

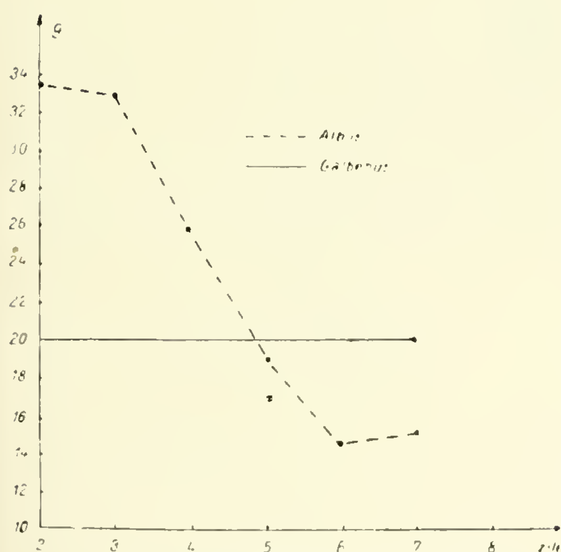


Fig. 401. — Variațiile albușului și gălbenușului. Metoda fierberii.

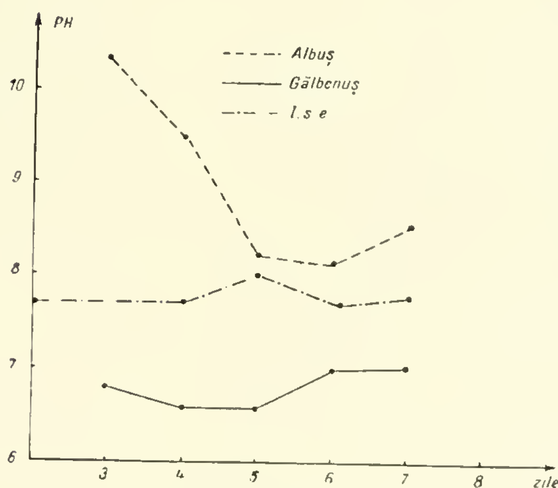


Fig. 402. — Variațiile pH-ului.

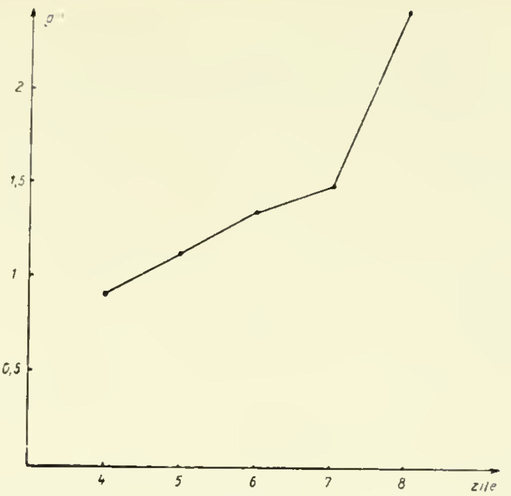


Fig. 403. — Variaţia lipidelor în lichidul subembrionar (extract alcool-eteric).

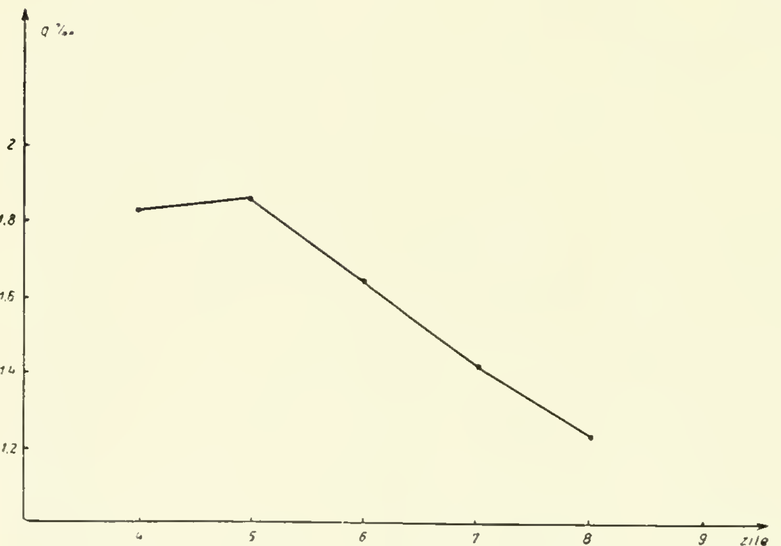


Fig. 404. — Glucoza în lichidul subembrionar.

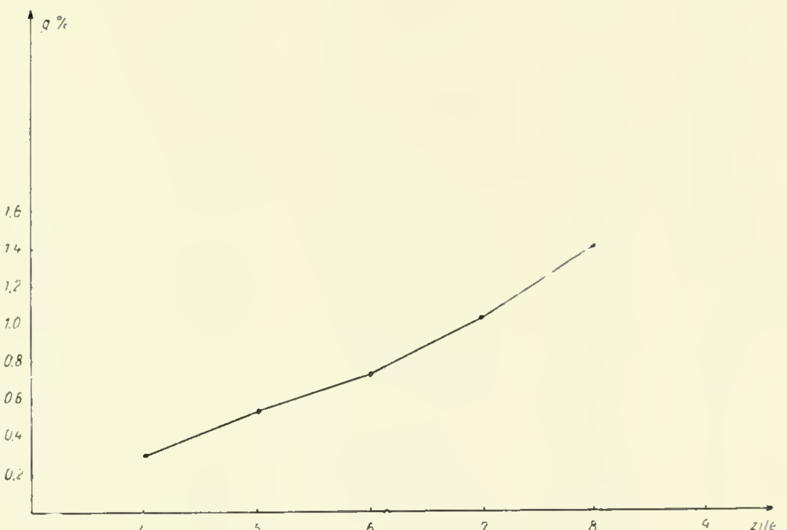


Fig. 405. — Protidele în lichidul subembrionar.

CERCETĂRI ASUPRA EFECTULUI INJECTĂRII DE LICHID SUBEMBRIONAR ÎN VEZICULA ALANTOIDIANĂ A EMBRIONULUI DE GĂINĂ

La baza acestor cercetări stă concepția miciurinistă despre efectul schimbării sau adăugării de substanțe „plastice" la embrion, metodă folosită în scopul modificării metabolismului și, prin aceasta, al diferențierii morfo-funcționale a organismului în timpul procesului ontogenetic.

Pentru a sili embrionul să absoarbă un surplus de lichid subembrionar, prelevat de la un alt embrion, ne stau la dispoziție mai multe căi experimentale :

1) Simpla depunere a lichidului pe suprafața membranei corion-alantoidiene, în vederea absorbției sale de către rețeaua vasculară, *2*) injecția lichidului în spațiul subembrionar a sacului vitelin, *3*) injecția în cavitatea amniotică sau *4*) în corpul propriu-zis al embrionului, sau, în sfîrșit, *5*) în cavitatea veziculei alantoidiene. Din toate aceste posibilități am ales injecția intraalantoidiană.

Posibilitățile absorbtive ale veziculei alantoidiene și introducerea, pe această cale, a unor substanțe în mediul intern al embrionului se cunosc de mult și îndeosebi din cercetările Verei Dantschakoff asupra resorbției foliculinei introdusă în sacul alantoidian. Vezicula alantoidiană, începînd cu a cincea zi de incubație, reprezintă un organ cavitar, cu o capacitate destul de mare pentru a primi cantități relativ însemnate de lichid subembrionar. Această capacitate crește între a șasea și a șaptea zi de incubație, cînd se pot injecta fără greutate, 2 ml de lichid în cavitatea sacului alantoidian. Bogata vascularizație alantoidiană garantează resorbția rapidă a lichidului injectat. Aceste avantaje contrastează cu dificultățile întîmpinate la celelalte căi de introducere, amintite mai sus. Depunerea unei cantități mai mari de lichid pe suprafața membranei alantoidiene riscă să asfixieze embrionul. Injecția intraembrionară a unei cantități atît de mari de lichid ar fi prea traumatizantă, iar condițiile de resorbție din cavitatea amniotică nu ne sînt cunoscute în suficientă măsură. Injecția în spațiul subembrionar sau în masa de albuș reprezintă posibilități pe care le vom studia într-o altă serie de cercetări.

Injectînd deci circa 2 ml de lichid subembrionar, prelevat de un embrion de aceeași rasă și aceeași vîrstă (5—6 zile de incubație) în vezicula alantoidiană a embrionului primitor, îl înzestrăm pe acesta, într-o anumită măsură, cu un al doilea sac vitelin — artificial creat —, din care el va putea resorbi surplusul de vitelus lichefiat, a cărui proveniență, mod de formare și compoziție au fost studiate în capitolele precedente.

Metoda poate fi folosită și pentru introducerea lichidului subembrionar heterospecific sau heterorasial, în vederea obținerii unor efecte de hibridare vegetativă. În cercetările pe care le relatăm aici este vorba numai de injecții homeorasiale de lichid subembrionar. Putem spune însă de pe acum că ne-am convins că embrionul primitor tolerează și lichidul de proveniență heterospecifică și heterorasială. În felul acesta am putut obține eclozimi de pui aparținînd rasei Leghorn, care au resorbit — ca embrioni — vitelus lichefiat de gîscă, de rață și de la rasa Plymouth (cercetări în colaborare cu B. Litvac). Nu am întreprins încă cercetări asupra reacțiilor imunologice pe care le-ar putea prezenta organismul mai tîrziu în urma injectării acestor substanțe.

Am putut verifica unele date, cunoscute din literatură, în legătură cu scăderea greutății oului în timpul incubației prin evaporare de apă. Pe baza datelor noastre, această scădere este, în mod normal, pînă la sfîrșitul incubației, de 12—18 g. Împreună cu acad. V. Mîrza am constatat că, la majoritatea ouălor care au primit o unică injecție de lichid

subembrionar în vezicula alantoidiană, această pierdere în greutate se poate reduce la mai mult de jumătate (5 — 6 g), deși cantitatea de vitelus injectat reprezintă numai 2 g.

Trebuie să tragem concluzia că, în urma introducerii lichidului subembrionar suplimentar, embrionul utilizează mai complet apa (și alte substanțe) pe care le are la dispoziție, reducînd pierderile sale normale prin evaporare (fig. 406, 407, 408, 409 și 410).

Ouăle de greutate medie ale rasei Leghorn, cu care lucrăm, cîntăresc circa 55 g. În ultima zi de incubație aceste ouă cîntăresc, în medie, 43 g. Puiul care eclozează prezintă o greutate medie de 35 g. Pierzînd 12 g prin evaporare, coaja oului cîntărind circa 6 g, circa 2 g de lichid evaporîndu-se de pe suprafața puiului eclozat, greutatea acestui pui în prima zi de ecloziune este de 35 g. În cazurile experimentale, evaporarea reducîndu-se la 5—6 g, puii eclozați atingeau în prima zi o greutate de 43 g.

Redăm rezultatele obținute în urma unei unice injecții intraalantoidiene de lichid subembrionar, făcută unei generații parentale (patru animale) din care am obținut două generații filiale succesive (F_1, F_2) (studii în colaborare cu D. Linția, Stenzer) și I. Linția. Generația parentală (P) s-a obținut în 1951, generația filială (F_1) în primăvara și vara 1952 (circa 60 de animale), generația filială (F_2) în primăvara 1953 (100 de animale). Animalele de experiență și cele de control aparțin unuia și aceluiași material de rasă pură Leghorn, îndelung observată în crescătoria noastră, amenajată pentru asemenea cercetări.

Pentru o justă apreciere a rezultatelor obținute prin studiul celor trei generații (P, F_I și F_2) este neapărat necesar :

1. să stabilim unele date referitoare la greutatea oului și pierderile de greutate suferite în timpul incubației ;

2. să descriem pe scurt mersul normal al dezvoltării individuale la rasa Leghorn, în condițiile regiunii și crescătoriei noastre.

În timpul incubației, oul pierde din greutate. Această pierdere se datorește, în cea mai mare parte, evaporării simple de apă și eliminării apei și bioxidului de carbon rezultate din procesele de metabolism. Un ou cu greutate medie de 55 g cîntărește, în medie, după 20 de zile de incubație, 43 g. A pierdut deci 12 g din greutatea inițială. Greutatea cojii fiind de circa 6—7 g și a lichidului care se usucă pe pui de 1—2 g, diferența dintre greutatea inițială a oului (la începutul incubației) și cea a puiului eclozat proaspăt — după uscarea pufului — este deci de circa 20 g.

Graficul din figura 411 arată la o serie de ouă normale neinfluențate, incubate de noi, raportul dintre greutatea inițială, greutatea după 20 de zile de incubație și cea a puiului eclozat.

Noi am ales o gamă de greutăți de ouă, de la cele mai ușoare pînă la cele cu o greutate excepțională (70 g). Se vede imediat că, indiferent de greutățile inițiale ale ouălor, diferența de greutate a puilor corespunzători eclozați din aceste ouă, față de greutatea inițială a oului, se menține foarte strîns în jurul valorii de 20 g. La ouăle cele mai grele (peste 62 g), diferența aceasta crește pînă la 22 g. Pe baza unei vechi experiențe a crescătorilor și a observațiilor noastre proprii ne credem deci îndreptățiți să admitem ca o regulă acest raport între greutatea oului înaintea incubației, la sfîrșitul incubației și greutatea puiului proaspăt ieșit din ou. Stabilirea raportului de aproximație : pui = greutatea inițială a oului minus 20 g este de o deosebită importanță pentru cercetările noastre.

Raportul acesta, cu toate oscilațiile existente (chiar curba din fig. 411 arată existența unor oscilații în jurul liniei „teoretice medii", care însă nu infirmă regula), reprezintă totuși pentru noi unul din criteriile de apreciere a gradului de folosire de către embrion a apei care îi stă la dispoziție în ou, în strînsă legătură cu intensitatea proceselor metabolice care duc la creșterea și diferențierea substanței vii. De asemenea trebuie luată aici în considerare folosirea calciului din coaja oului de către embrion, despre care va fi vorba mai tîrziu.

Puiul eclozat și hrănit în condiții normale se dezvoltă și crește continuu pînă la vîrsta de 7 luni. La 7 luni, perioada de creștere poate fi considerată terminată. Animalul a ajuns la „pragul adult de greutate", adică la greutatea maximă atinsă la sfîrșitul perioadei de creștere, cînd ea se stabilizează la o valoare care prezintă în decursul vieții ulterioare unele oscilații (sezoniere, în timpul năpîrlirilor), dar rămîne, în mare, constantă. În al doilea an de viață, valoarea medie a greutății urcă încet și atinge în acest an cifra maximă.

La atingerea pragului adult de greutate, găinile ajung la maturitate sexuală, cocoșii de obicei cu 1—2 luni mai devreme. Ouatul începe deci imediat după terminarea perioadei de creștere. Găina pierde succesiv în sezonul de ouat 100—200 g din greutatea ei, chiar la o hrănire normală. O găină Leghorn normală poate depune pînă la 200 de ouă în primul an de ouat. În timpul ouatului, găina pierde grăsimea de depozit și carotenul. În timpul năpîrlirii pierde penajul, dar se recuperează greutatea și carotenul. Perioada de năpîrlire ține de la 7 săptămîni pînă la 2 luni. În acest timp găina nu ouă. Spre sfîrșitul perioadei de năpîrlire, greutatea se urcă din nou peste greutatea inițială.

Greutatea atinsă la 7 luni poate fi considerată ca un criteriu general de dezvoltare a animalului și servește drept caracteristică a vitalității.

Perioada optimă pentru clocire este între lunile martie și aprilie. În felul acesta, puiul ajunge la pragul adult de creștere în luna noiembrie. Practica avicultorilor arată că clocirile de vară sau de toamnă nu dau niciodată rezultatele celor de primăvară. Cauza pentru care clocirea de primăvară este mai favorabilă trebuie căutată în condițiile formării vitelusului și albușului în organismul matern în acest anotimp și în condițiile de viață ale puilor eclozați.

Hrana naturală de primăvară a galinaceelor — plante verzi proaspete (bogate în vitamine), insecte etc. —, temperatura potrivită, umezeala aerului, condițiile atmosferice, lumina etc. permit organismului matern să asimileze și să concentreze în vitelus și apoi în albuș substanțe de anumite calități și proporții care diferă de cele asimilate în celelalte anotimpuri. În timpul iernii, ouatul este mai redus în urma cheltuirii energiei pentru menținerea temperaturii corpului.

Primăvara, întreaga energie stă la dispoziția producției de ouă. În căldurile de vară, găinile nu consumă decît puțină hrană calorică, ceea ce face ca intensitatea ouatului să scadă din nou.

Este important ca prima perioadă de dezvoltare a puilor să nu coincidă cu căldurile de vară sau cu frigul și umezeala de toamnă tîrzie. Experiența a arătat că puii de toamnă sau de vară rămîn în urmă față de puii de primăvară. Această înapoiere se manifestă la animale în greutate și în randamentul lor de ouat în tot timpul vieții lor.

Galinaceele domestice pot atinge vîrsta de 10 ani și mai mult. Capacitatea de ouat este maximă în primul an, descrește în anul al treilea de viață, este slabă în anul al

patrulea, decăzînd apoi rapid. Din punct de vedere economic, numai primii 2 ani contează în viața găinii ca productivitate de ouă.

Pentru aprecierea ritmului de creștere a lotului de animale neinfluențate, cu care trebuie să comparăm rezultatele obținute la lotul nostru experimental, dăm acum tabelele lor de creștere obținute în crescătoria noastră, în condiții normale.

Graficul din figura 412 arată curba medie de creștere a cocoșilor și găinilor Leghorn normale, eclozate primăvara (clocire artificială). La atingerea pragului adult, după 7 luni greutatea medie a cocoșilor a fost de 2 210 g, a găinilor de 1 720 g.

Graficul din figura 413 arată curba de creștere la animalele noastre neinfluențate, clocite în lunile de vară. Se remarcă la găini o medie mai coborîtă de greutate la atingerea pragului adult față de clocirea de primăvară. Cele 7 găini examinate variază ca greutate la 7 luni între 1 120 și 1 450 g.

Se remarcă, în general, o încetinire a creșterii în a cincea lună.

Aceste cifre ne arată deci, în medie, ritmul normal de dezvoltare a păsărilor de rasă Leghorn în condițiile noastre.

Uneori se observă în crescătorie animale — în afara condițiilor experimentale — cu o dezvoltare peste normă. Înregistrăm de exemplu o găină care a atins spontan, la 7 luni, 1 820 g.

DEZVOLTAREA GENERAȚIEI PARENTALE, OBȚINUTĂ ÎN ANUL 1951 ÎN URMA INJECȚIEI DE VITELUS LICHEFIAT ÎN VEZICULA ALANTOIDIANĂ

Trebuie subliniat de la început că la obținerea generației parentale de la care a pornit întreaga experiență pe care o descriem aici nu am dispus de condiții experimentale optime. Neavînd încă pusă la punct metoda injecției de vitelus și luptînd cu alte greutăți de ordin tehnic, nu am putut obține animale eclozate decît în lunile iunie, iulie și august 1951. Generația parentală obținută reprezintă deci o ecloziune de vară, în consecință în inferioritate față de dezvoltarea unor animale de primăvară. Sfîrșitul perioadei de creștere a acestor animale a căzut în lunile de iarnă. Considerăm scoaterea acestei generații în lunile de vară ca o greșeală, comisă la începutul cercetărilor noastre, din lipsă de experiență. Graficul din figura 414 arată curbele de creștere (și greutățile) obținute la atingerea pragului adult de creștere.

Procesul de creștere, stînjenit în lunile de iarnă, a continuat cu o lună peste normal a durat deci 8 luni, cînd animalele au atins următoarele greutăți : cocoșii 2 250 și 2 270 g, găinile 1 800 și 1 850 g. Se vede că aceste greutăți depășesc totuși valorile corespunzătoare mediei animalelor noastre normale de vară. Numai după atingerea acestor greutăți, găinile au început ouatul.

Rezumînd, putem afirma că rezultatele obținute la generația parentală nu pot prezenta date valabile pentru o justă apreciere a valorii injecției de vitelus, date fiind condițiile nefavorabile descrise.

Totuși, supragreutățile inițiale și iuțeala dezvoltării în primele săptămîni, cît și greutățile obținute la sfîrșitul perioadei de creștere, au justificat urmărirea unei prime generații obținute din ouăle acestor animale. Ne credem îndreptățiți să presupunem că rezultatele ar fi fost mai bune dacă am fi obținut ecloziuni de primăvară. Continuarea experienței a confirmat presupunerea noastră.

În privința randamentului de ouă, prima găină din generația parentală (nr. 55) a depus 183 de ouă de la 13 martie 1952 pînă la 13 martie 1953. Greutatea medie a ouălor găinii nr. 55 în primul an a fost de 62 g (media normală la noi 55 g). Remarcăm că această găină provine dintr-un ou de 59 g. Este interesant de remarcat că în timpul ouatului din primul an (pînă la prima năpîrlire) această găină a pierdut numai 80 g din greutate în loc de 100 pînă la 200 g. Media de greutate a ouălor găinii nr. 55 s-a ridicat în anul 1953 pînă la 64 g. Printre ouăle depuse în anul 1953 s-au înregistrat însă și greutăți pînă la 73 g și s-au obținut pui cu greutate de 53 g la ecloziune (media la noi de 35—38 g).

Cealaltă găină (nr. 54) din generația parentală experimentală a început ouatul la 2 martie 1952 și a depus pînă în iunie 1952, 70 de ouă cu o greutate medie de circa 55 g. acest animal a fost însă pierdut.

PRIMA GENERAȚIE FILIALĂ F_1 OBȚINUTĂ DIN OUĂLE GENERAȚIEI PARENTALE DESCRISE ÎN ANUL 1952.

Ouăle au fost incubate în trei serii: o serie în incubator, două serii prin clocire naturală. Am obținut ecloziuni de primăvară și vară. Ecloziunile de primăvară datează din aprilie și mai 1952, cele de vară din iunie și iulie 1952.

Faptul important pe care-l putem observa aici este că (cu o singură excepție) din toate ouăle incubate, în număr de 62, au eclozat pui cu supragreutăți obținute de data aceasta în mod spontan, fără injecția prealabilă de vitelus în alantoidă. Aceste supragreutăți sînt în medie mai mari la ouăle de la găina nr. 54 decît la cele de la găina nr. 55.

Graficele din figura 415 arată pentru cele două găini parentale greutățile ouălor, la începutul incubației, la 20 de zile de incubație și greutățile puilor proaspăt eclozați. Supragreutățile obținute de la ouăle găinii nr. 54 variază între 4 și 8 g, cele de la găina nr. 55 variază între 2 și 5 g.

Caracterul „supragreutate la ecloziune" obținut la generația parentală direct prin injecția de vitelus apare aici și la prima generație filială.

În schemele arătate, diferența dintre greutatea oului după 20 de zile de incubație și greutatea puiului proaspăt eclozat se datorește greutății cojii și a lichidului care se evaporă pe puful puiului și de pe suprafața interioară a oului. Această diferență (reprezentată de coajă plus lichid) este la ouăle netratate în medie de 9,25 g, la ouăle găinii nr. 55 de 7,91 g iar la ouăle găinii nr. 54, numai de 6,84 g.

Acest lucru se poate explica printr-o resorbție mai intensă a calciului din coajă de către embrionul cu metabolismul modificat.

Dezvoltarea lotului de primăvară F_1 1952. În compoziția acestui lot intră animale care au prezentat supragreutăți spontane la ecloziune, cum a fost arătat înainte. Lotul de primăvară se compune dintr-un cocoș și patru găini. Curbele lor de creștere (graficul din figura 416), în comparație cu martorii, arată însemnatele diferențe obținute la lotul experimental. Cele patru găini din lotul experimental au cîntărit la atingerea pragului adult (7 luni) 1 950 g, 2 050 g, 1 850 g și 1 900 g. Cele patru găini de control au cîntărit, la aceeași epocă, în medie 1 640 g (1 820 g, 1 640 g, 1 710 g, 1 480 g). Unicul cocoș pe care-l posedăm în acest lot a depășit 3 000 g la 7 luni. Cocoșul a atins această greutate la 6 luni. El provine dintr-un ou de 55 g, deci de greutate mijlocie, și a cîntărit la ecloziune 43 g, avînd o supragreutate spontană de 8 g. Cei doi cocoși de control

cîntăreau la aceeași dată 2 250 și 1 850 g. Diferența depășește deci 1 000 g. Vom descrie mai amănunțit acest caz într-un aliniat special. Remarcăm însă o găină din lotul martor, care în decursul dezvoltării a întrecut media lotului experimental (găina FBT 362).

Lotul de vară al primei generații filiale. În graficul din figura 417 se observă greutatea atinsă la 7 luni de cele 18 găini din acest lot, variind între 1 750 și 1 550 g (media 1 650 g). Cele șapte animale de control variază în aceleași condiții între 1 450 și 1 120 g (media 1 280 g).

Evidenta micșorare a lărgimii variabilității la cele 18 animale de experiență, față de lărgimea variabilității la 7 animale de control, este semnificativă. Diferența medie obținută între cele două loturi este de circa 350 g. Restrîngerea lărgimii de variabilitate la animalele lotului experimental este un indicator al gradului de fixare a caracterului nou.

Cei 21 de cocoși din acest lot variază ca greutate între 2 200 și 1 620 g, cu o medie de 1 805 g față de media martorilor de 1 460 g. Cocoșii nu sînt indicați în graficul din figura 417 (20 cocoși din acest lot au fost distribuiți Gospodăriei de stat „Beregsău"). Menționăm că printre cocoșii martori se găsesc șase exemplare care au atins media lotului experimental.

GENERAȚIA FILIALĂ (F_2). LOTUL DE PRIMĂVARĂ 1953

Pentru obținerea generației filiale F_2 1953 au fost selecționate, 75 de ouă provenite de la găinile loturilor de vară și de primăvară 1952, descrise mai înainte. Aceste ouă au prezentat o greutate medie de 61 g (greutatea medie a ouălor din care a ieșit generația F_1, precedentă, era de 59 g). Majoritatea covîrșitoare a puilor ieșiți prin clocire artificială și naturală în primăvara anului 1953 din aceste ouă prezentau supragreutăți pînă la 8 g. Greutatea medie a puilor eclozați a fost de 45 g, iar valoarea medie a supragreutăților, de 4 g. Cu excepția a patru pui, întregul lot prezintă deci, și în această generație, însușirea observată la F_1, transmisă ereditar de la generația parentală, care a primit în anul 1951 injecția intraalantoidiană de vitelus lichefiat. (fig. 418, 419, 423, 424, 425, 426 și 427).

Graficul din figura 428 arată sinoptic valorile medii ale ouălor, ale puilor proaspăt eclozați și ale animalelor adulte în cele trei generații observate (1951, 1952, 1953). Din analiza greutăților medii reiese reapariția supragreutăților puilor și a supragreutăților la atingerea pragului adult. Ceea ce este deosebit de important, este și caracterul progresiv, adică accentuarea din generație în generație a modificării obținute.

În decursul acestor experiențe, din 1951 pînă în 1953, am putut spori greutatea medie a puilor proaspăt eclozați, de la 41 pînă la 48 g. Subliniem că am obținut un număr de pui excepționali de 52 și 53 g, greutăți neobișnuite pentru rasa Leghorn.

În acest sens credem că este demonstrativă experiența de control pe care am executat-o în primăvara 1953. În această experiență au fost clocite natural și artificial laolaltă ouăle animalelor din generația F_1 și ouăle animalelor neinfluențate obișnuite, de aceeași rasă, care cresc pînă la maturitate în aceleași condiții cu lotul experimental în crescătoria noastră. Am ales ouăle celor două loturi cu aceeași greutate medie de 58 g. În lotul martor (neinfluențat), 58 g de ou, au dat 37 g de pui: deci un gram sub greutatea normală. Aceeași greutate de ou (58 g) din lotul experimental a dat însă 42,41 g pui: deci o supragreutate medie de 4,41 g.

Graficele din figura 429 arată greutățile oului și ale puilor corespunzători din cele două loturi ale experienței de control.

EXPERIMENTĂRI CU OUĂ GRELE (63—70 g)

La găini Leghorn de un an, asemenea greutăți de ouă sînt rare; ele sînt ceva mai frecvente la animalele selecționate de 2—3 ani (efecte de selecționare). Două dintre aceste găini au murit cu fenomene de prolaps, cu hemoragia oviductului.

Dintr-un lot de 35 de asemenea ouă pe care le-am injectat cu vitelus lichefiat homeorasial și homeostadial am obținut 8 ecloziuni spontane. Din aceștia au rămas în viață, în cele din urmă, cinci animale. Animalele au eclozat între 23 aprilie și 5 mai 1952. Greutățile puilor la ecloziune variau între 44 și 49 g. În această serie s-au obținut deci numai în două cazuri supragreutăți la ecloziune. Avem impresia că metoda nu dă rezultate imediate — în ceea ce privește supragreutatea la ecloziune — cînd este aplicată la ouă excepțional de grele (peste 65 g).

Totuși, evoluția ulterioară a acestor animale dovedește existența influenței injecției. Astfel, cei doi cocoși din acest lot au atins la pragul adult 2 420, respectiv 2 800 g, aceasta față de doi martori proveniți tot din ouă mari, însă neinjectate, care au atins numai 1 910 și 2 190 g.

Cele trei găini provenite din ouăle injectate au atins la 7 luni 2 500; 1 900 și 1 860 g față de patru găini martore provenite din ouă grele neinjectate, care au atins 1 400; 1 450; 1 480; 1 800 g. Vedem deci și aici o diferență medie de 390 g la găini și de 600 g la cocoși.

Credem că este intersantă — în legătură cu cele expuse — descrierea a trei cocoși eclozați în aceeași zi, 23 aprilie 1952, însă de proveniență diferită (fig. 420).

Este vorba: a) de cocoșul nr. 123 FBT, cap de serie din lotul de primăvară 1952 (descris în capitolul respectiv) din generația filială F_1, provenit dintr-un ou de 55 g și cu o greutate de 43 g la ecloziune (supragreutate de 8 g). Oul provine de la găina nr. 51, generația parentală, care a primit injecția de vitelus.

Al doilea cocoș, b) nr. 74 FBT, provine dintr-un ou mare de 65 g, care a fost injectat cu vitelus. Puiul a cîntărit la ecloziune 49 g, avea deci o supragreutate de 4 g.

Al treilea cocoș, c) nr. 1 023 FBT, provine dintr-un ou neinjectat de 69 g (ou greu). Puiul a cîntărit 49 g la ecloziune (greutate normală).

Avem deci de-a face aici cu trei animale, dintre care unul (*a*) face parte din prima generație filială descendentă din animale injectate, al doilea (*b*) provine dintr-un ou de categorie grea injectat, iar al treilea (*c*) provine dintr-un ou neinjectat.

	A (*F* 1)	*B* (injectat)	*C* (neinjectat)
Greutatea oului	55 g	65 g	69 g
Greutatea puiului la ecloziune	43 ,,	49 ,,	49 ,,
Greutatea atinsă la pragul adult	3 000 ,,	2 420 ,,	1 910 ,,

B și *C*, cu aceeași greutate la ecloziune, prezintă o diferență de 510 g la atingerea pragului adult, în favoarea celui injectat cu toate că animalul *C*, neinjectat, provine dintr-un ou mai greu decît *B*. Animalul *A*, descendent F_1, cu toate că provine dintr-un ou de greutate normală (de greutate mijlocie) și avea la ecloziune o greutate mai mică decît *B* și *C*, a atins totuși greutatea remarcabilă de 3 kg la 7 luni (fig. 421 și 422).

Aceste cifre pledează pentru manifestarea crescîndă a efectului injecției de vitelus în generațiile succesive.

Din studiul literaturii sovietice reiese că rezultatele pe care le-am obținut printr-o singură injecție de vitelus lichefiat în vezicula alantoidiană la o generație parentală sînt superioare celor obținute prin metode zootehnice înaintate. Astfel, în cartea lui

89 — c. 1778

G. M. Kolobov și N. N. Iaiținin, „Crescătoria de găini în sovhozuri", p. 10, sînt descrise rezultatele obținute în crescătoria sovhozului „Arjenka" (16 500 de găini) din 1948 pînă la 1950.

Creșterea greutății medii a găinilor ce s-a obținut în al doilea an a fost :

	1948	1949	1950
Greutatea medie	1 740 g	1 850 g	1 950

Remarcăm media de plecare sovietică în 1948, mai ridicată decît media de plecare în regiunea noastră (de la care am plecat noi în experiențele noastre). Reiese că s-a obținut în doi ani o creștere a greutății medii a găinilor adulte de 210 g.

Aplicarea metodei practicată de noi cu injecția de vitelus a produs în doi ani o creștere a greutății medii de 340 g.

De asemenea, I. K. Sabelev obține, prin modificarea cîmpului de excursie a găinilor, o creștere a greutății medii a puilor proaspăt eclozați de la 41,5 la 43,1 g. Reamintim că valorile medii obținute de noi în 1953 sînt de 45 și 48 g pentru puii proaspăt eclozați.

Experiențele expuse pot fi rezumate astfel :

În vezicula alantoidiană a embrionului de găină rasa Leghorn (ouă de greutate mijlocie, 55—60 g) s-au injectat în a cincea zi de incubație 2 ml de lichid subembrionar provenit de la ouă de aceeași rasă și aceeași vîrstă. Majoritatea puilor obținuți au prezentat supragreutăți la ecloziune, luîndu-se ca bază a evaluării greutății normale a puilor, greutatea inițială a oului, minus 20 g (regulă stabilită de noi în prealabil).

Puii au prezentat de asemenea o creștere mai rapidă față de martori. Greutățile atinse la sfîrșitul perioadei de creștere (7 luni) depășesc greutățile martorilor. Producția de ouă este la un nivel bun. Prima generație filială obținută din aceste animale a prezentat, în mod spontan, supragreutăți la ecloziune, caracter obținut prin metoda injecției intraalantoidiene de vitelus la generația parentală. Greutățile atinse la sfîrșitul perioadei de creștere depășesc și la prima generație filială, în medie, greutățile martorilor crescuți în aceleași condiții și în același loc, cu 350 g. Între animalele primei generații filiale se găsesc exemplare deosebit de bine dezvoltate ; cităm de exemplu un cocoș care la 6 luni a depășit 3 kg.

Injecția de lichid subembrionar la embrionii proveniți din ouă deosebit de grele, 65—70 g, fără să dea supragreutăți notabile la puii proaspăt eclozați, determină totuși o dezvoltare mai rapidă față de martori proveniți de asemenea din ouă grele.

A doua generație filială prezintă de asemenea supragreutăți spontane la ecloziune. Am obținut pui cu greutăți de 53 g (!) în prima zi.

Noi atribuim aceste rezultate unei modificări a metabolismului embrionului prin îmbogățirea într-un stadiu precoce de dezvoltare a surselor sale plastice.

Trebuie să admitem că metabolismul schimbat produce o modificare a eredității, ale cărei efecte le-am putut urmări pînă acum în două generații succesive.

În experiențele noastre am folosit deocamdată lichidul subembrionar al unui donator de aceeași vîrstă și aceeași rasă cu primitorul. Nu am realizat deci hibridări vegetative. Procedeul permite însă, prin întrebuințarea unui lichid subembrionar de altă rasă sau specie sau a unor amestecuri de lichide, asimilarea, într-o perioadă embrionară precoce, a substanțelor embriotrofice elaborate de un partener cu ereditate diferită.

Pînă acum am reușit să obținem pui viabili care au asimilat vitelus de gîscă sau de rasă Plymouth. Studiul celor două generații filiale descrise arată că modificările ereditare obținute sînt progresive.

În crescătorie se observă uneori cazuri spontane de dezvoltare peste normal a unor animale. Prin metoda studiată putem obține însă acest lucru la un număr mai mare de animale și într-un șir de generații. Majoritatea covîrșitoare a animalelor experimentale au întrecut martorii în greutate. În unele cazuri — ce-i drept, rare — dezvoltarea s-a menținut în limite normale.

Ne propunem să dezvoltăm metoda prin folosirea lichidului subembrionar heterorasial, heterospecific și heterostadial și prin alte variante tehnice.

BIBLIOGRAFIE

1. Kolobov G. M., i Iaițiuin N. N., *Ptițevodstvo v sovhozah*, Moscova, Selhozghiz, 1952.
2. Menkes B. și Mîrza V., *Aplicarea metodelor miciuriniste în dezvoltarea embrionară la animale III. Efectul injectării vitelusului lichefiat în vezicula alantoidiană a embrionului de găină*. Bul. științ. Acad. R.P.R. Secțiunea de științe medicale, 1952, t. IV, nr. 3, p. 601.
3. Penjonkievici E. E., Sabelev I. K. i Grigoriev G. K., *Soderjanie domașnei ptiți v pole*, Selhozghiz, 1951.
4. *** *Ptițevodstvo*, Selhozghiz, 1952.
5. Tretiakov N. P., *Inkubațiia iaiț domașnei ptiți*, Selhozghiz, 1952.
6. *** *Trudi Naucino-issledovatelskogo instituta ptițevodstva*, t. XXII, Selhozghiz, 1952.

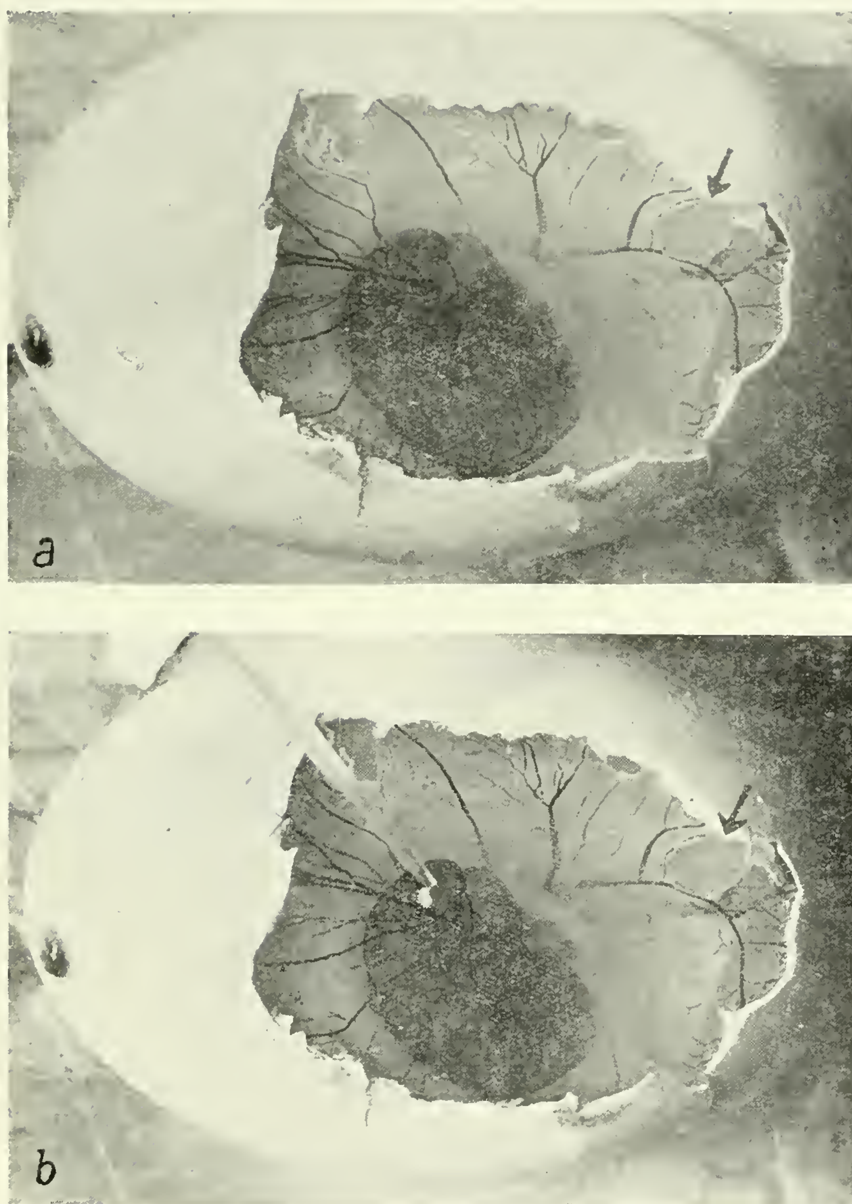


Fig. 406. — *a* și *b* — Tehnica injecției intraalantoidiene cu vitelus lichefiat. Ou de 5 zile de incubație, larg deschis pentru demonstrație. Se vede sacul alantoidian injectat. El acoperă parțial corpul embrionar, spre care converg vasele viteline. Sacul vitelin a fost deschis la (↓). Prin acest orificiu se pot aspira în acest moment circa 15 ml vitelus lichefiat.

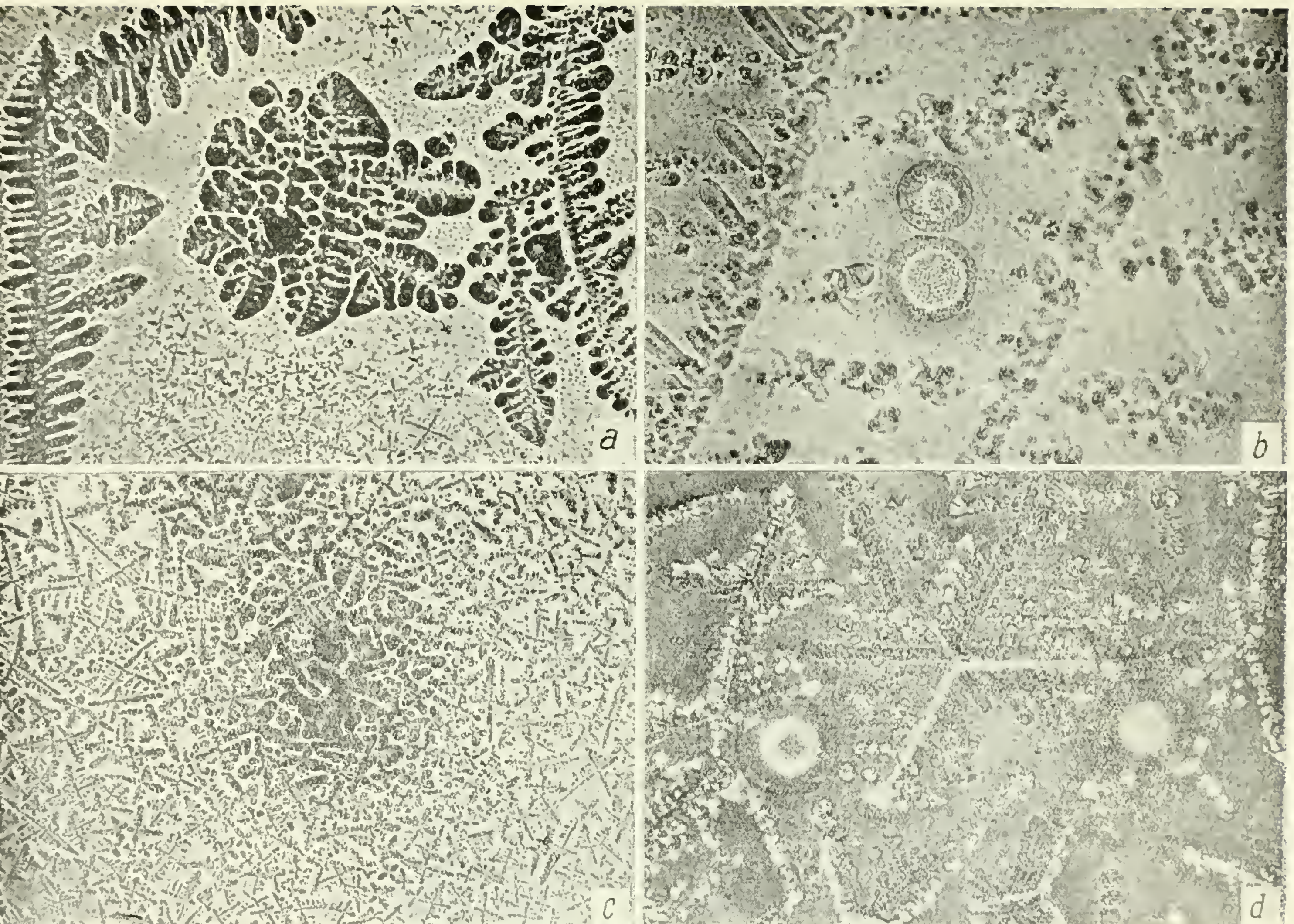


Fig. 407. — (*a*, *b*, *c* și *d*). Prinse miuscarea vitelusului lichefiat se obțin aceste cristale, printre care se găsesc globule de vitelus.



Fig. 408 — Pui Leghorn la ecloziune. În a cincea zi de incubaţie i s-au injectat 2 ml lichid vitelin în sacul alantoidian. Greutatea la ecloziune 43 g. Alături de pui, coaja calcară a oului şi fereastra făcută pentru injecţie.

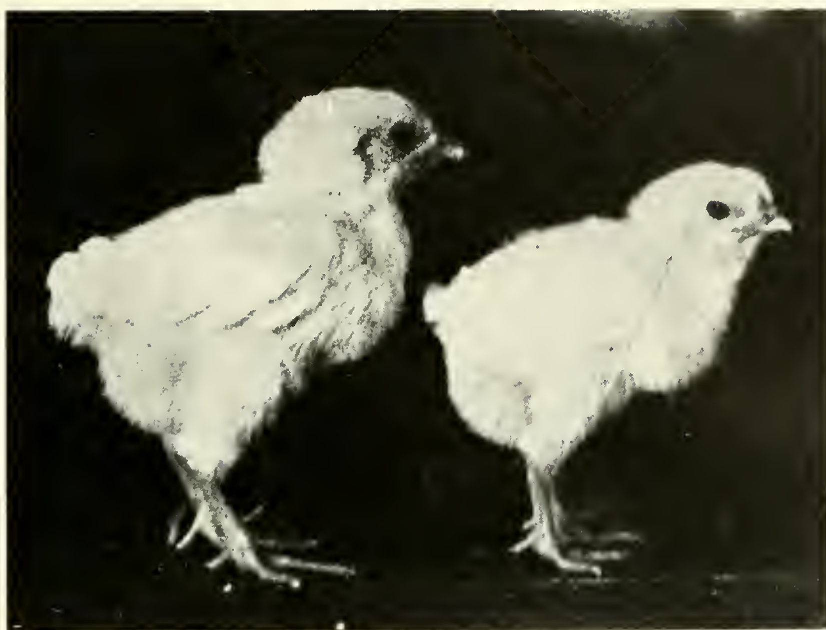


Fig. 409. — Puiul din figura 408 alături de un martor, la o săptămînă după ecloziune.

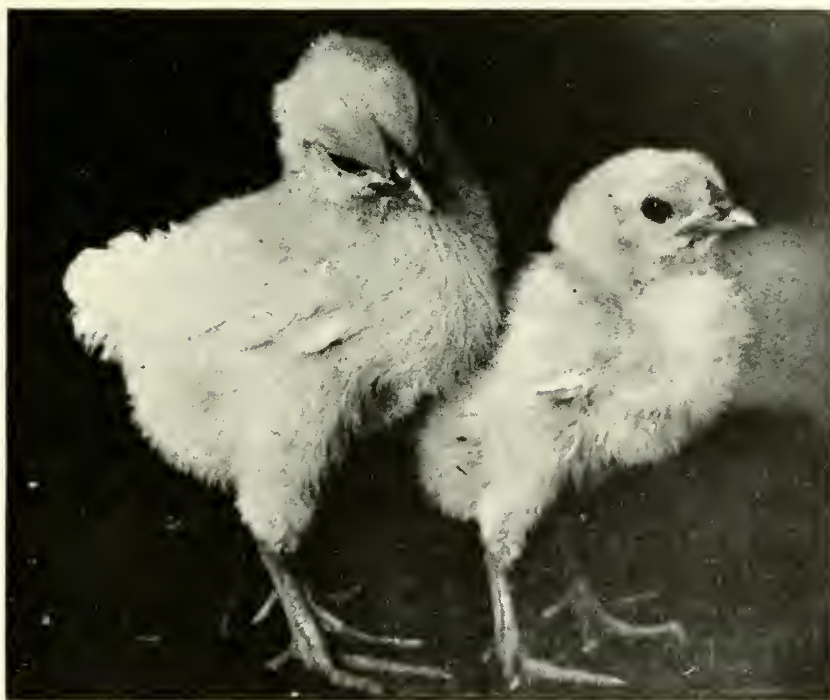


Fig. 410. — Altă poziție a puiului din figura 408 împreună cu martorul.

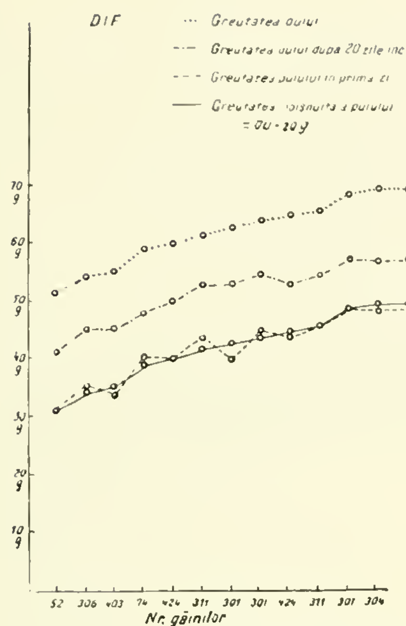


Fig. 411. — Raportul normal dintre greutatea oului la începutul incubației, la sfîrșitul incubației, și greutatea puiului proaspăt eclozat, a cărui greutate este în medie egală cu greutatea oului dinainte de incubație, mai puțin 20 g.



Fig. 412. — Curbe de creștere normală (martori) pentru animalele de primăvară. Cocoșii ating 2 000 — 2 500 g, iar găinile 1 500 g la 7 luni.

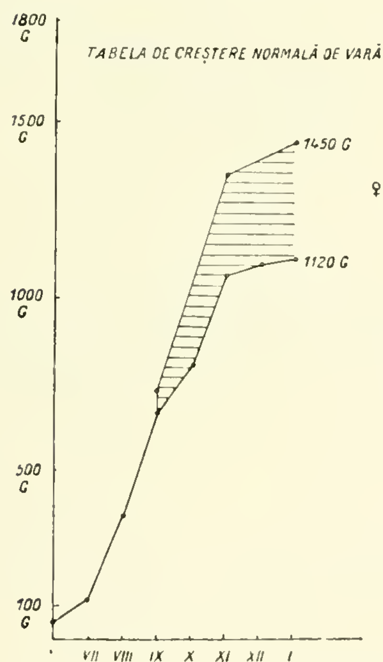


Fig. 413. — Curbe de creștere la găini normale, clocire de vară. Greutatea găinilor la 7 luni variază între 1 120 și 1 450 g.

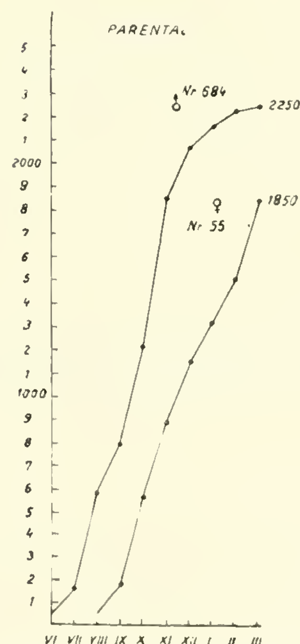
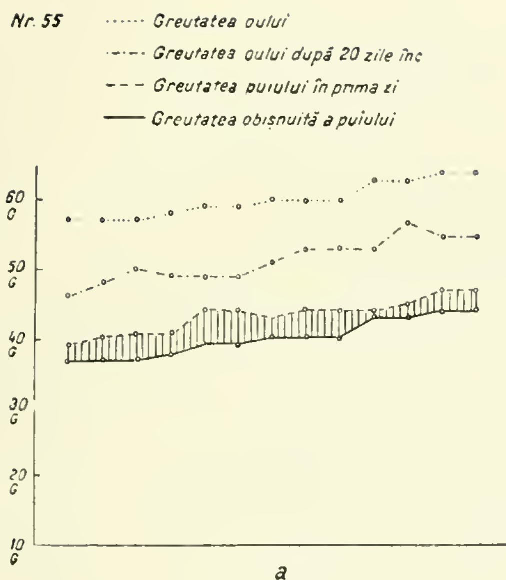
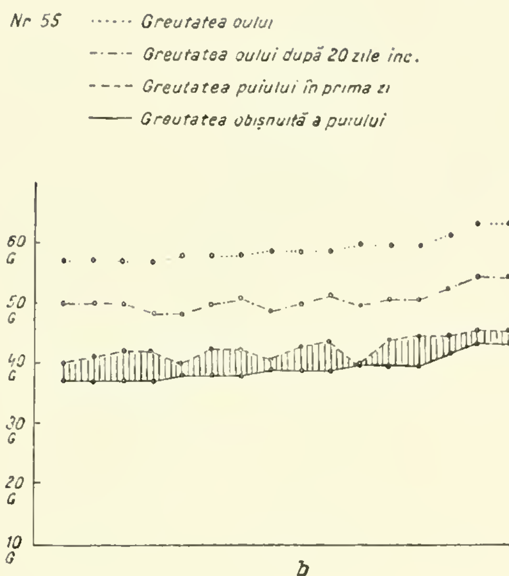
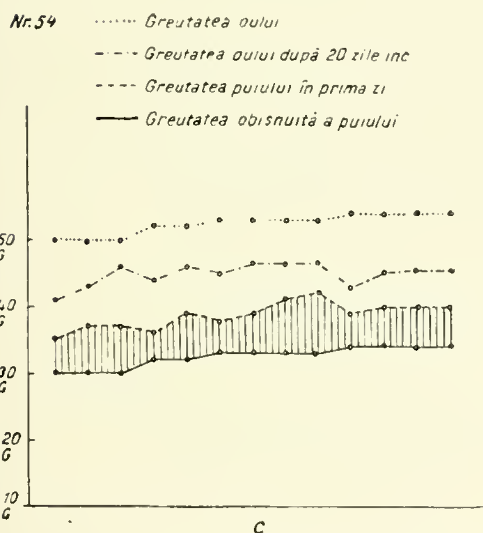


Fig. 414. — Curbe de creștere ale unei perechi din generația parentală experimentală.







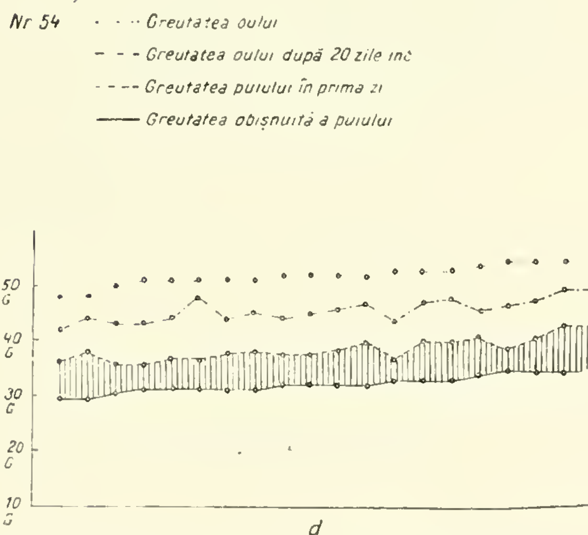


Fig. 415. — *a*, *b*, *c* și *d* — Greutățile ouălor și puilor corespunzători F_1, obținuți de la găinile generației parentale. Se remarcă, mai cu seamă la găina nr. 54, supragreutățile spontane.

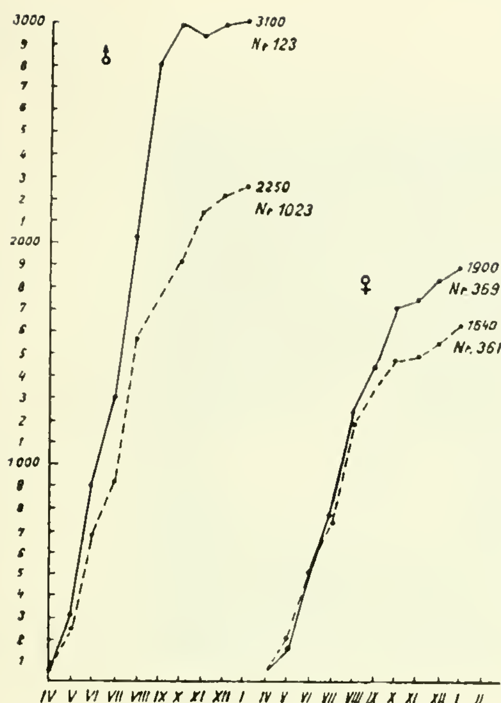


Fig. 416. — Curbele de creștere ale lotului de primăvară F_1 (curbele punctate sînt martori); cocoșul a atins 3 kg la 6 luni.

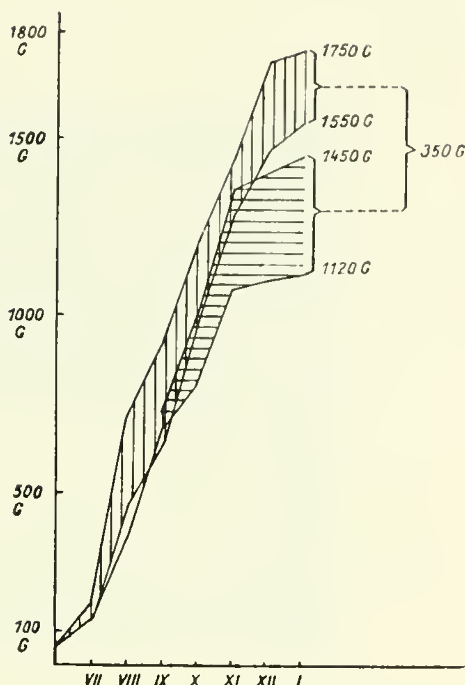


Fig. 417. — Curbele de creștere ale lotului de vară al generației F_1 (hașurat vertical) în comparație cu lotul de martori (hașurat orizontal). Maximele lotului de martori se suprapun în parte (în a treia pînă în a șasea lună) cu zona lărgimii de variabilitate a lotului experimental. Lotul experimental cuprinde 18 găini, lotul martori 7 găini. De remarcat lărgimea restrînsă a variabilității la lotul experimental.

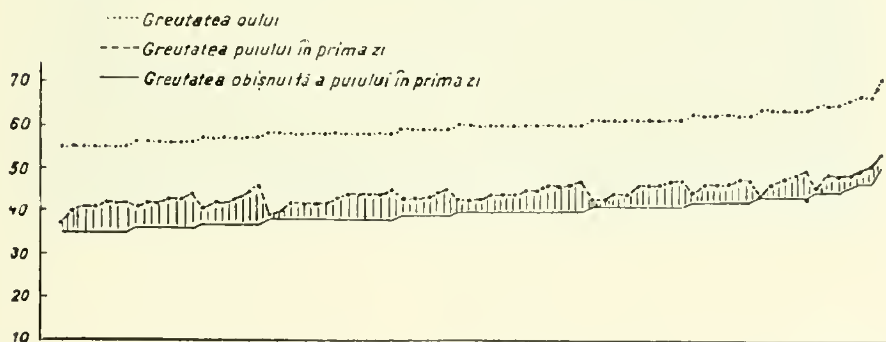


Fig. 418. — Greutatea ouălor înaintea incubației și greutatea puilor corespunzători proaspăt eclozați din generația F_2 (1953). În afară de patru cazuri, toți puii prezintă la ecloziune în mod spontan supragreutăți.

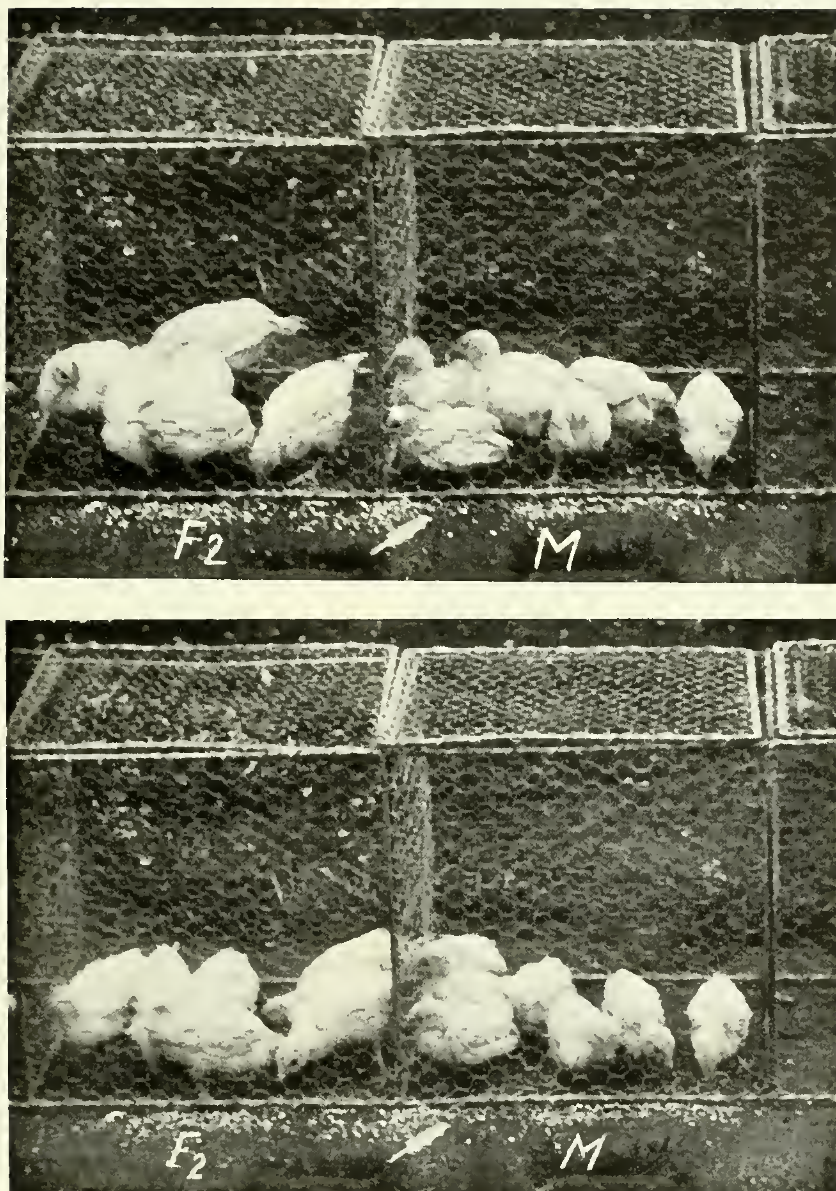


Fig. 419. — Puii generației F_2, în comparație cu pui martori.



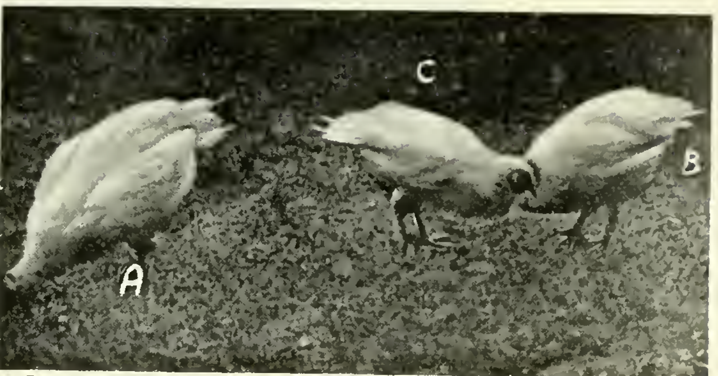


Fig. 420. — Cocoşii *a*, *b*, *c*, (eclozaţi în aceeaşi zi), la vîrsta de 2 luni.
A – Descendent F_1 al generaţiei parentale injectate; *B* – Martor tratat; *C* – Provine dintr-un ou greu, neinjectat.

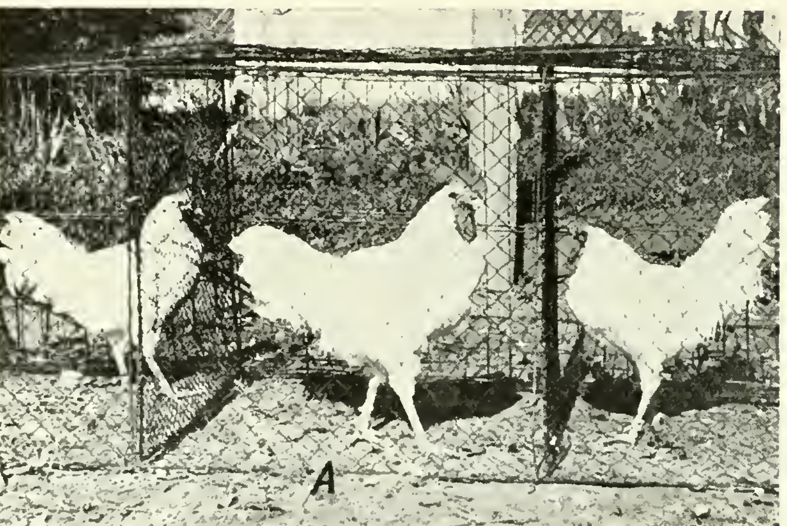


Fig. 421. — Aceleaşi animale din fig. 420, la vîrsta de 7 luni.

Fig. 422. — Altă imagine la 7 luni.

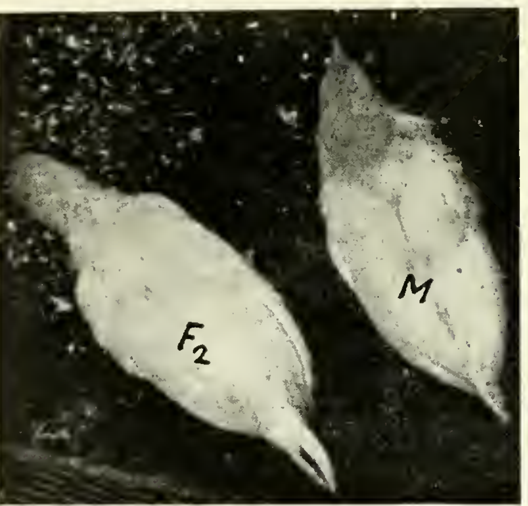


Fig. 423. — Generația F_2 alături de un martor normal.

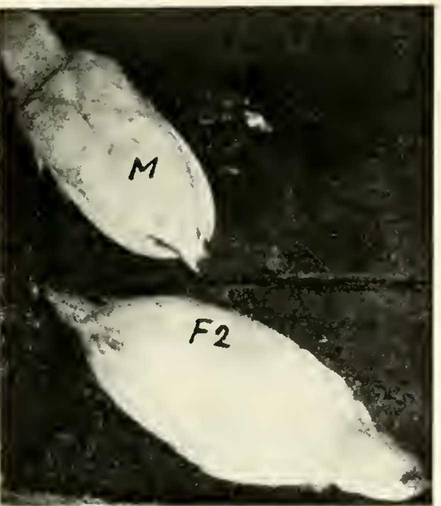


Fig. 424

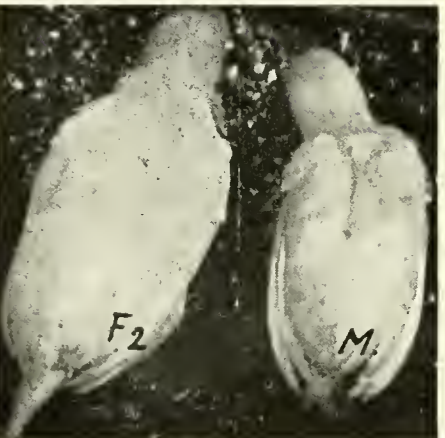


Fig. 425

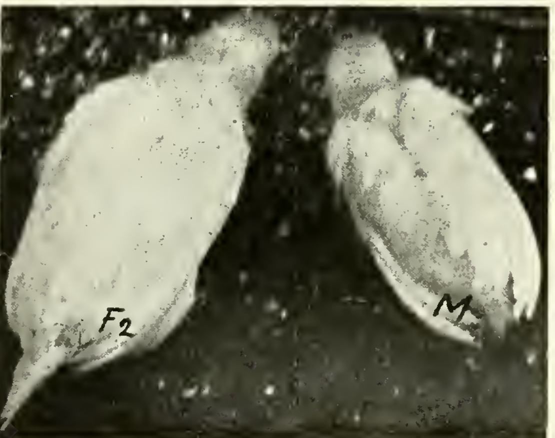


Fig. 426

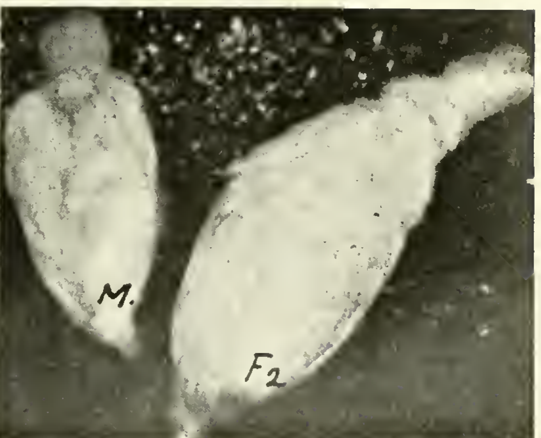


Fig. 427

Fig. 424, 425, 426 și 427. — Alte animale din același lot ca și cele din fig. 423.

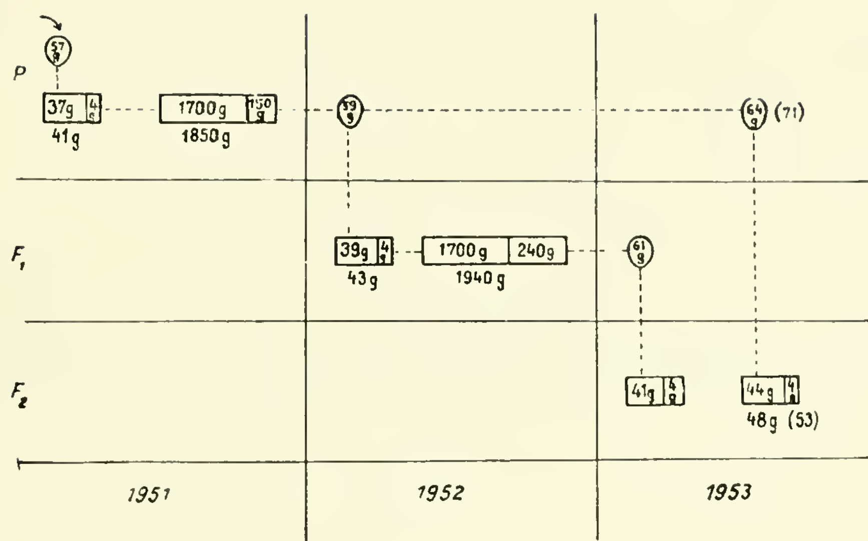


Fig. 428. — Tabel sinoptic al valorilor medii exprimînd greutățile ouălor, ale puilor din prima zi și la atingerea pragului adult de 7 luni la generațiile experimentale P, F_1, F_2. Se remarcă caracterul progresiv al greutăților medii.

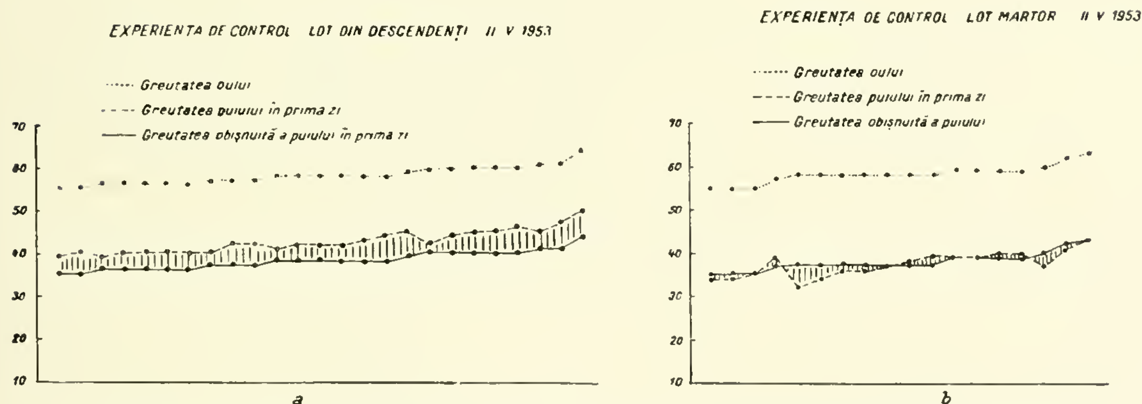


Fig. 429. — *a* și *b* — Experiența de control 1953. Ouă de aceeași greutate luate de la lotul experimental F_1 și de la martori. Se vede neta deosebire a greutăților puilor proaspăt eclozați, aparținînd acestor două loturi. Puii din lotul experimental prezintă supragreutăți spontane, puii martori greutăți normale sau subnormale.

ИССЛЕДОВАНИЯ ПО ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЭМБРИОЛОГИИ

ТОМ I

Р Е З Ю М Е

ВВЕДЕНИЕ

В введении автор излагает свою теорию относительно источника движущих сил в процессе индивидуального развития.

Процессы развития живых существ постоянно являются комплексами взаимодействий. Они могут быть исследованы и объяснены только путем выявления и анализа — с последующим синтезом — всех элементов, условий, моментов, находящихся в постоянном превращении и участвующих в создании взаимодействующего комплекса, который находится в основе процесса развития и может быть назван «онтогенетическим комплексом». Здесь анализируется эмбриональная фаза этого онтогенетического комплекса («эмбриональный комплекс»).

Независимо от филогенетической давности образования или функции наследственного происхождения, они осуществляются в течение индивидуального развития только благодаря последовательности актуальных процессов, существующих в эмбриональном комплексе.

Но каждый из этих процессов представляет самое новое выражение длинного исторического процесса.

Составные части тела зародыша всех степеней, его придатки и эмбриотрофические вещества, материнский организм и окружающая его среда (или самого яйца соответственно личинки) образуют составные элементы эмбрионального онтогенетического комплекса.

Производить анализ составных элементов этого комплекса и их функций это значит выявить движущие силы онтогенетического процесса развития.

Убеждение в том, что совокупность этих сил может быть выражена при помощи эмбрионального «онтогенетического комплекса» и имеет как источник этот комплекс, исторически определенный, вытекающий из взаимодействий, в нем происходящих, является — по мнению автора — одной из основ диалектико-материалистического учения об онтогенезе.

Вступительная глава иллюстрирована рядом схем, представляющих «теорию об эмбриональном онтогенетическом комплексе».

Исследования, приведенные в этой работе, в основном произведены автором совместно с коллективом по экспериментальной эмбриологии Научно-исследовательской базы Академии РНР в городе Тимишоара.

ЧАСТЬ I

ВВЕДЕНИЕ В МЕТОДИКУ НАБЛЮДЕНИЯ IN VIVO И ПРЯМЫХ ВМЕШАТЕЛЬСТВ НА ПТИЧЬЕМ ЗАРОДЫШЕ

Эта часть предназначается в первую очередь тем, кто желает изучить экспериментальную эмбриологию. Как видно из оглавления, здесь описываются и некоторые оригинальные методы автора, как например:

а) Техника экспериментального миэлосхизиса.

б) Пересадка на тело зародыша при помощи миэлосхизиса.

в) Деамниотизация.

г) Деаллантоизация.

д) Культура «в яйце».

В конце этой части есть три приложения:

1. Первое приложение занимается систематизацией методов и технических приспособлений в экспериментальной эмбриологии на основании принципа «структурных отделов».

Здесь методы и техника систематизированы по структурному уровню, на котором сначала производится вмешательство при помощи соответствующей техники. Например: метод, который адресуется «ультраструктурному (субмикроскопическому) отделу», «отделу микроскопических структур», «отделу макроскопических структур».

2. Второе приложение относится к чисто химическим методам, более часто применяемым в экспериментальной эмбриологии.

3 Третье приложение описывает, для более легкой ориентировки, нормальную анатомию куриного зародыша на разных стадиях онтогенеза.

ЧАСТЬ II

ИССЛЕДОВАНИЕ РАЗВИТИЯ РЕАКТИВНОСТИ ЗАРОДЫША И ЕГО ПРИДАТКОВ

Между составными частями «эмбрионального комплекса» развиваются взаимодействия, из которых вытекают движущие силы процесса индивидуального развития. Это значит, что каждая отдельная часть организма зародыша реагирует (каждая часть разным образом) на воздействия других частей эмбрионального комплекса, становясь в свою очередь новым радражителем в процессе развития этих частей.

Результат этих сложных взаимодействий можно, таким образом, рассматривать как эффект реактивности составных частей эмбрионального комплекса — «взаимодействующая реактивность».

Виды этих реактивностей меняются количественно и качественно для каждой отдельной части эмбрионального организма в течение прохождения стадий индивидуального развития.

В эмбриональном онтогенезе должны находиться последовательность и усложнение видов реактивности, начиная с элементарных форм, подобных существующим у простейших (клеточные движения, фагоцитоз, внутриклеточное пищеварение и т. д.), и кончая гуморальными и нейро-гуморальными формами.

Из вышеизложенного видна связь между взаимодействием составных частей эмбрионального комплекса, их реактивностью и самым онтогенетическим процессом. С этой точки зрения можно считать весь эмбриональный онтогенетический процесс — в его морфологическом и функциональном аспекте — как проявление реактивности составных живых частей зародыша и его придаточных экстраэмбриональных органов, которая развивается как сложная система взаимоотношений, находящихся в непрерывном превращении.

Исходя из учения И. И. Мечникова, который ставит реактивность в основу появления первых филогенетических ступеней и, в особенности, в основу перехода от простейших к многоклеточным, исследование реактивности составных частей эмбрионального комплекса становится средством для анализа онтогенетического процесса.

ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕНОМЕНА ФАГОЦИТОЗА У КУРИНОГО ЗАРОДЫША

Описывается ряд экспериментальных исследований для определения фагоцитарной способности эмбриональных клеток из различных частей зародыша и в разные стадии процесса развития.

Введение разведенной китайской туши в подзародышевую полость дает после 2 дней инкубации сильный фагоцитоз туши клетками желточной энтодермы (главным образом в области желточного вала). Желточную энтодерму можно считать обширным « фагоцитобластом ».

Описываются результаты межуточного введения туши (в ткани и органы зародыша), в общую полость, в амнион, в аллантоис и в особенности в сосудистую систему, в центральный канал нервной трубки.

Эпителий амниона является фагоцитирующим в отличие от покровного эпителия тела зародыша, который не имеет этого свойства.

Реактивность хориоаллантоисной оболочки исключительно велика.

Фагоцитирующими мезенхимальными элементами являются клетки типа макрофагов, нагруженные каплями жира. Они фиксируют трипановый синий.

В этой главе уделяется особое внимание исследованию фагоцитоза меланических зерен из собственных меланобластов макрофагами зародыша. Это явление изучается in situ и в тканевой культуре (зародышевые покровы пигментированных пород птиц).

Фагоцитоз туши был изучен в тканевой культуре, и была отмечена большая фагоцитирующая способность мезенхимальных клеток.

Таким образом, у куриного зародыша фагоцитоз является с самого начала онтогенеза видом реактивности эмбриональных клеток, тесно связанной с функциями питания и с важными прогрессивными морфогенетическими процессами. Фагоцитоз играет также важную роль в процессе перестройки и ограничения собственного клеточного материала (регрессивные онтогенетические процессы).

Начиная с первых дней своего существования зародыш имеет возможность реагировать и против некоторых чужеродных тел, введенных искусственно или случайно. Реактивность, связанная с питательной и защитной деятельностью, наслаивается в начале онтогенеза.

Кроме макрофагов и мезенхимальных элементов, сосудистый эндотелий и некоторые эпителии обладают фагоцитирующей способностью. Нервная трубка не фагоцитирует за исключением эпителия крышки ромбовидного мозга.

Но не все эмбриональные образования имеют одновременно ту же степень реактивности. Так, внезародышевые оболочки обнаруживают более высокую реактивность, чем элементы, которые входят в состав тела зародыша.

Этим явлением занимаются исследования, описанные в следующих главах.

ИССЛЕДОВАНИЕ ГИПЕРПЛАСТИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ ХОРИОАЛЛАНТОИСНОГО ЭПИТЕЛИЯ И ПОКРОВНОГО ЭПИТЕЛИЯ ТЕЛА КУРИНОГО ЗАРОДЫША

Эпителий хориоаллантоисной оболочки и эпителий покровов тела зародыша подвергаются действию целого ряда « раздражителей » (неорганические тела, гомео- или гетероспецифические эмбриональные или взрослые органы, злокачественные опухоли).

Хориоаллантоисный эпителий энергично реагирует, в особенности на злокачественные опухолевые ткани, производя гиперплазии, эпителиальные жемчужины и эпителиальные перекладины, которые развиваются в направлении «раздражающего» трансплантата.

В противоположность этой сильной реактивности хориоаллантоисного эпителия, покровный эпителий тела, подвергнутый действию тех же раздражителей и исследованный в том же возрасте, при появлении реакции в хориоаллантоисной оболочке, представляет только очень мало изменений.

Эти экспериментальные данные интерпретируются в смысле реактивности, приобретенной покровными оболочками у яйценосных Sauropsida в течение филогенеза. Действительно, через поры скорлупы яйца постоянно проникают микроорганизмы до первого живого слоя яйца, который приобретает особенную реактивность.

Тело зародыша, находящееся в глубине, не обладает пока этой реактивностью.

Обсуждается рабочая гипотеза связи между описанным явлением и филогенетическим появлением плаценты у живородящих.

РЕАКТИВНОСТЬ ТЕЛА ЗАРОДЫША И ХОРИОАЛЛАНТОИСНОЙ ОБОЛОЧКИ НА ТУБЕРКУЛЕЗНУЮ ИНФЕКЦИЮ

Как и в исследованиях, описанных в предыдущей главе, реактивность в отношении туберкулезной инфекции явно отличается как морфологическое проявление в хориоаллантоисной оболочке и в теле зародыша.

В то время как в оболочке развивается обильная воспалительная ткань, бугорки, синпласты и эпителиальные гиперплазии, в теле зародыша отмечается более или менее полное отсутствие реактивности даже в присутствии вирулентных бацилл.

ИССЛЕДОВАНИЕ РАЗВИТИЯ И РЕАКТИВНОСТИ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ У КУРИНОГО ЗАРОДЫША

Эмбриональный онтогенез нельзя успешно изучить, рассматривая отдельно каждую часть зародыша. Разные участки и составные части эмбрионального тела, принадлежащие макро-, микро- и субмикроскопической областям, питательные вещества, придатки зародыша, родительские организмы и их среда, все эти основные компоненты в процессе эмбрионального развития, образующие эмбриональный онтогенетический комплекс, надо рассматривать в тесной связи и взаимодействии на разных стадиях онтогенеза.

То, что совокупность актуальных движущих сил онтогенетического процесса берет начало в этом исторически определенном «онтогенетическом комплексе» и то, что они порождаются из взаимодействий, происходящих в этом комплексе, является одной из основ диалектико-материалистического понятия об онтогенезе.

Нужно допустить существование специфических взаимоотношений на каждой стадии онтогенеза, имеющихся даже в его самых ранних фазах. Эти взаимоотношения в действительности отождествляются с деятельностью составных частей эмбрионального организма на этих периодах.

Роль, которую играют разные составные части эмбрионального организма и всего эмбрионального комплекса в этой взаимодействующей системе, меняется на каждой ступени развития. По мере дифференциации тканей и органов, дифференцируются и их взаимоотношения.

Осуществление онтогенетического процесса, прохождение каждой стадии требуют для каждой части эмбрионального тела присутствия определенного комплекса условий, закрепленного в течение филогенеза.

На основании этой концепции не могут быть допущены «предфункциональные» периоды.

До достижения функционального и морфологического сходства с вполне развитым организмом — «взрослый физиологический порог» — эмбриональные органы могут быть связаны путем взаимоотношений и, следовательно, могут иметь функции, отличающиеся количественно и качественно от конечных («взрослых») функций.

Существует, однако, постоянная эволюция взаимоотношений между составными элементами зародыша, которая явно проявляется именно прогрессированием морфо-функциональной дифференциации.

Знание всех этих актуальных взаимодействий и их последствий, филогенетических историй было бы равносильно пониманию всего процесса индивидуального развития.

Целью исследований, описанных в этой главе, является установление места, которое занимает эмбриональная нервная система в области взаимодействий, находящихся в основе эмбрионального развития, роли, которую она играет в течение развития последовательных онтогенетических ступеней в этой системе, и воздействий, которые она в свою очередь претерпевает в это время.

В литературе существуют многочисленные исследования в этой области, дающие очень разноречивые результаты. В то время, как одни авторы доходят до отрицания влияния эмбриональной нервной системы на процесс дифференциации остальных органов, другие авторы, напротив, приписывают эмбриональной иннервации важную роль в онтогенезе.

Вероятно, до начала морфо-функциональной дифференциации нервной передачи раздражений в течение онтогенеза нервные зачатки действуют только гуморальным путем или путем общей возбудимости протоплазмы от клетки к клетке.

В предпринятых исследованиях применялся метод экстирпации местных разрушений, повторного открытия нервной трубки в области спинного и ромбовидного мозга, при помощи техники механических и термических вмешательств и лучевых агентов.

Широкое применение нашли здесь и методы трансплантации и эксплантации эмбриональных органов в сегменты без иннервации, использование меланогенеза, как показателя нейро-гуморальной дифференциации, и разницы в скорости дифференциации нейро-эндокринной системы у выводковых и птенцовых птиц.

ВМЕШАТЕЛЬСТВА НА СПИННОМ МОЗГЕ ПОВТОРНОЕ ВСКРЫТИЕ МЕДУЛЛЯРНОЙ НЕРВНОЙ ТРУБКИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ МИЭЛОСХИЗИС

Экспериментальное повторение вскрытия нервной трубки у куриного зародыша трехдневной инкубации (экспериментальный миэлосхизис) было осуществлено автором и сотрудниками в 1948 году.

Изучается эффект этого вмешательства на спинном мозге и на ближайших органах.

Получается нервная пластинка, растянутая на дорзальной поверхности зародыша. Таким образом, эпендимальную поверхность спинного мозга можно непосредственно наблюдать в течение долгого времени.

Под нервной пластинкой образуется мезенхимальная полоса, которую некоторые авторы ошибочно считают фактором, обусловливающим появление спонтанных врожденных пороков развития (spina-bifida).

Автор прибегает к методу экспериментального миэлосхизиса для имплантации в открытую нервную борозду.

ИССЛЕДОВАНИЕ РАЗВИТИЯ ФУНКЦИЙ ЭМБРИОНАЛЬНОГО СПИННОГО МОЗГА, ЕГО РЕГЕНЕРАТИВНЫХ И КОМПЕНСАТОРНЫХ ВОЗМОЖНОСТЕЙ ПОСЛЕ ОГРАНИЧЕННЫХ РАЗРУШЕНИЙ

Производятся разрушения спинного мозга зародыша 3-дневной инкубации при помощи термокоагуляции.

Спинной мозг разрушается частично или полностью на протяжении 5—10 сегментов на уровне верхних или нижних конечностей.

Производится предварительно повторное вскрытие нервной трубки (экспериментальный миэлосхизис), затем термокоагулятор вводится в нервную борозду и прижигается эпендимальная поверхность спинного мозга.

Эмбриональный спинной мозг способен к регенерации. В течение первых дней после операции образуются многочисленные центральные каналы, от которых начинается регенеративный процесс. От центрального отрезка спинного мозга (на уровне оперативного дефекта) отходят новообразующиеся нервные стволы.

Эти стволы направляются:

а) к вентральвому участку, проходя через склеротом, а затем через образованный, тем временем, позвоночник;

б) к сомитам и к мускулатуре боковой стенки туловища;

в) к сохранившимся после прижигания спинальным узлам, потерявшим связь с соответствующим сегментом спинного мозга; новообразовавшиеся отростки приносят, таким образом, ряд двигательных волокон остатку спинального нерва, который после вмешательства сохранил из спинального ганглия только афферентные волокна нервных клеток;

г) к симпатическим узлам.

Спинальные ганглии, оставшиеся в области медуллярного дефекта, могут потерять любую связь с спинным мозгом, Они остаются связанными с периферией через их афферентные аксоны.

Через 5—10 дней после вмешательства конечности, соответствующие пораженному участку, являются всегда иннервированными. Однако их нервные стволы тоньше нормальных. Конечности сохраняют нормальную конформацию до 12 или 13-го дня инкубации. Сохраняются и их типичные движения резкого разгибания и сгибания. При осмотре на 16-й день инкубации в области конечностей зародышей со спинальными дефектами, наблюдаются извращенные положения пальцев, пальцы-«когти», атрофические пальцы и полная их неподвижность, которая резко отличается от нормальных движений у контрольных зародышей.

Из этих экспериментальных данных видно, что иннервация соответствует потребностям дифференциации в первом периоде эмбрионального онтогенеза, но становится недостаточной для потребностей процесса развития в последующем периоде, в течение которого целостность соответствующего медуллярного сегмента необходима для развития и для морфо-функциональной дифференциации нормальных конечностей.

ВМЕШАТЕЛЬСТВА НА МОЗГОВЫХ ПУЗЫРЯХ
ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТОВ ПОВТОРНОГО ВСКРЫТИЯ РОМБОВИДНОГО МОЗГА И РОЛИ ЭПЕНДИМАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ В РАЗВИТИИ МОЗГА

Описывается механизм скопления жидкости в мозговых пузырях. В конечном итоге эта жидкость происходит из большого депо воды, находящегося в белке яйца. Сосудистая система мозговых пузырей изучается при помощи инъекций туши.

На второй день инкубации производится разрез тонкой крышки ромбовидного мозга, что создает сообщение между эпендимальными и экстраэмбриональными полостями.

Это вмешательство исключает скопление под давлением больших количеств жидкости в среднем и переднем мозге. Во всех случаях, в которых ромбовидный мозг остается открытым, происходят значительные деформации среднего мозга и запоздание в развитии переднего мозга. Эти опыты доказывают значение давления эпендимальной жидкости для дифференциации мозговых пузырей.

РАЗРУШЕНИЕ ПЕРЕДНЕГО И СРЕДНЕГО МОЗГА У КУРИНЫХ ЗАРОДЫШЕЙ ПОСЛЕ 30—45 ЧАСОВ ИНКУБАЦИИ

После этой операции зародыши могут оставаться живыми. Получаются бульбарные зародыши, у которых из головного мозга сохранился только продолговатый мозг. Следовательно, у этих бульбарных зародышей отсутствует, за исключением продолговатого, весь головной мозг, нижний придаток мозга, шишковидная железа, глазные яблоки и лицевой скелет. Удалось продолжить жизнь таких зародышей в течение 14 дней. У этих зародышей всегда отмечается celosomia и развитие замедленно в сравнении с контрольными зародышами.

РАЗРУШЕНИЕ ГЛАЗНОГО ЯБЛОКА

Разрушение путем термокоагуляции глазного яблока на второй день инкубации ведет всегда к пороку развития лицевого скелета, который называется «косой клюв». В оперированных случаях соответствующий зрительный путь отсутствует.

Следовательно, давление, существующее в глазном яблоке, является необходимым механическим фактором для нормального развития лицевого скелета. Одностороннее отсутствие этого фактора ведет к вышеуказанному уродству.

ЧАСТЬ III

ИССЛЕДОВАНИЕ В ОБЛАСТИ БИОЛОГИИ ГЕТЕРОТРАНСПЛАНТОВ

Автор подходит экспериментально к проблеме типа онтогенеза. Изучается поведение эмбриональных органов (в данном случае покровов) у птенцовых видов птиц при пересадке их на зародыши, принадлежащие выводковым видам и наоборот.

Отдельные части кожных покровов, взятые у голубиных зародышей (пигментированная порода) 7—8-дневной инкубации, трансплантируется ортотопно зародышу леггорна (вид, имеющий выводковый тип онтогенеза) 3-дневной инкубации.

Исследуются рост трансплантов, поведение меланобластов (соответственно промеланобластов), в особенности распространение их из транспланта в организме хозяина, переход промеланобластов в окрашенные меланобласты.

Иннервация и васкуляризация трансплантов изучается при помощи импрегнации серебром и путем введения туши в сосуды.

Предварительно изучаются факторы развития и дифференциации из покровов птичьего зародыша. Затем приступают к изучению гетеротрансплантов из покровов.

Особенный интерес представляет поведение голубиных промеланобластов, введенных породе леггорн.

Как известно, зародыши окрашенных пород голубей почти не пигментированы, их покровы практически содержат только промеланобласты. Транспланты таких покровов хорошо развиваются при пересадке на леггорнов, оставаясь непигментированными. Однако промелачобласты, мигрирующие из трансплантов в покровы хозяина, превращаются там в окрашенные меланобласты. Подобный результат получается и с эмбриональными покровами попугая (действие местного, покровного, фермента, возможно пирокатехиназы).

У выводковых хозяев пигмент птенцовых появляется, следовательно, гораздо быстрее, чем в норме.

Это ускорение зависит от развития покровных нервных окончаний у хозяина. Комбинации покровов леггорна и голубя в тканевой культуре, или на хориоаллантоисной оболочке (следовательно в средах без иннервации) никогда не проявляют такой ранней меланизации.

Обратная трансплантация, то есть трансплантация покровов выводковой пигментированной породы (например курица породы плимут) на птенцового хозяина (голубь), иллюстрирует отсутствие распространения меланобластов плимута в покровах хозяина.

В то время как покровы куриных являются акцептором меланобластов или промеланобластов, покровы голубя отталкивают их.

Исследования доказывают, что тип онтогенеза (выводковый - птенцовый) передает с самого начала онтогенеза тончайших деталей процесса развития свою специфичность.

Вообще установлено, что путем трансплантации могут быть не только компенсированы потери тканей или функций (заместительный трансплант), но и переданы хозяину новые свойства. В этом смысле можно различать хозяев, принимающих или непринимающих распространяемые элементы транспланта.

ЧАСТЬ IV

ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИЙ НЕКОТОРЫХ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ОРГАНОВ

Традиционные эмбриофизиологические исследования расширяют изучение функций взрослых — вполне дифференцированных — органов, захватывая предродовый период или период перед вылуплением, давая возможность наблюдать проявления этих функций во все более ранних онтогенетических фазах, вплоть до самого начала их.

Таким образом, одной из проблем эмбриофизиологии является установление момента «появления» в эмбриональном органе специфической функции, более или менее схожей с функцией взрослого органа. Другой стороной этих исследований является установление отношения морфологической дифференциации к появлению этой специфической функции.

Таким образом все эти исследования исходят фактически из взрослого органа и позволяют проследить — до некоторой степени в обратном порядке — хорошо известную функцию взрослого дифференцированного субстрата во все более и более молодых стадиях зародыша до первых признаков его проявления.

В. Ру является создателем известной общей схемы фаз, через которые, согласно этой схеме, проходит орган в течение онтогенеза. По В. Ру, орган проходит сначала через афункциональный или предфункциональный период, в течение которого его развитие происходит исключительно на основании наследственности, а затем входит в свой функциональный период, в течение которого орган моделируется функциональными стимулами, то есть самим своим функциональным процессом. По В. Ру, в этом периоде развитие и даже сохранение органа зависит, главным образом, от осуществления своей специфичекой функции (период появления функциональной структурности).

Таким образом, согласно этой теории, зачаток каждого эмбрионального органа проходит через первый «предфункциональный» период с основными морфогенетическими процессами, до определенного момента, когда появляется гистологическая дифференциация; этот момент совпадает более или менее с началом «функциональной» фазы.

Теория В. Ру о «предфункциональном» периоде фактически характеризуется разделением формы от функции в определенной стадии онтогенеза, допуская в течение некоторого времени развитие форм и структур, рассматриваемых как афункциональные, и отделяя таким образом факторы развития от функций зачатков

и органов зародыша. Это кажется тем более странным, что В. Ру известен как один из ярых защитников идеи о существовании связи между формой и функцией.

Однако на основании диалектическо-материалистического учения об онтогенетическом развитии нельзя допустить сущестования предфункциональных фаз, в течение которых развитие было бы отделено от функции.

Ища источник причин индивидуального развития во взаимодействиях, развивающихся в онтогенетическом комплексе, и считая эффект этих взаимодействий как проявление реактивности живого вещества (эта реактивность изменяется количественно и качественно на разных ступенях онтогенеза), нельзя отделить функции эмбриональных зачатков от взаимодействий, которые эти функции поддерживают между ними.

Как уже было сказано, существует постоянное развитие этих взаимодействий и, следовательно, функций эмбриональных органов на разных ступенях развития, которое ведет в разных для каждого органа (и для каждого вида) периодах к так называемому «взрослому функциональному порогу», то есть к появлению функций, специфических для вполне развитого органа.

Следовательно, «взрослый функциональный порог» это не пограничная метка, отделяющая один функциональный период от другого функционального периода, а критическая точка функционального качественного изменения. Эти критические моменты, связанные с изменениями типа обмена веществ, находятся во многих случаях, как например у куриного зародыша, в соотношении с такими явлениями, как развитие желточного кровообращения, переход к гематозу посредством аллантоисного кровообращения, образование подзародышевой жидкости путем перемещения воды из белка в желток и др.

Эмбриональный онтогенез представляет таким образом ряд переходных периодов, в течение которых происходят изменения условий развития.

Эти переходные периоды изучаются не только ради их значения в исследовании развития функций эмбриональных органов, но и для того чтобы этим путем найти (в свете учения В. Мичурина) способы направить течение онтогенеза по новым путям, изменяя условия развития в течение этих периодов.

Мичуринское учение допускает возможность расшатывания наследственности при помощи таких вмешательств.

Нельзя допустить существование функциональных или предфункциональных эмбриональных органов. До достижения взрослого морфо-функционального порога эмбриональные органы могут иметь взаимоотношения и функции, отличающиеся количественно и качественно от конечных.

Эмбриональный орган является всегда необходимым результатом взаимодействий всего эмбрионального комплекса и, в свою очередь, фактором в этом комплексе, проявляющим таким образом свою функцию. Следовательно, каждый эмбриональный орган проходит несколько функциональных фаз до появления специфической функции, то есть функции, подобной существующей во вполне развитом организме.

Функции, необходимые для жизнедеятельности и развития зародыша, могут иметь два рода морфологических субстратов:

1. Органы, имеющие унитарное развитие, которые остаются таковыми от начала до конца онтогенеза, постоянно приспосабливаясь к нуждам эмбрионального комплекса, как например: сердце, печень.

2. Комплексы органов, предназначенные для выполнения сходных функций, но представленные топографически отдельными компонентами, которые доходят до их специфической функциональной фазы в разные стадии онтогенетического процесса, принадлежащие, однако, одному и тому же функциональному комплексу.

Эти эмбриональные органы могут быть названы гомеофункциональными в том смысле, что они предназначены для исполнения одной и той же функции.

Как пример гомеофункциональной пары можно указать хориоаллантоис и легкие.

Начиная с 8-го дня инкубации главным дыхательным органом птичьего зародыша является хориоаллантоис. Однако он сосуществует с другим дыхательным органом, а именно легким, который дифференцируется медленно в течение эмбрионального онтогенеза и доходит до своей «взрослой» специфической функции немного

раньше вылупления, когда зародыш начинает дышать воздухом из воздушной камеры. В этот момент начинается обратное развитие хориоаллантоиса.

В приведенном примере оба партнера гомеофункциональной пары это различные органы, топографически отдаленные, один внутризародышевый, а другой внезародышевый.

В случае первичной и вторичной почек (мезо- и метанефрос) наблюдается последовательность (во времени и в пространстве) топографически раздельных носителей выделительных функций. Однако здесь последовательность происходит раньше, в течение эмбрионального онтогенеза, происходящего до вылупления, а оба партнера пары принадлежат эмбриональному телу.

Независимо от того, будет ли вся нефрогенная масса (про-, мезо- и метанефрос) рассматриваться как единый «голонефрос», последовательно дифференцирующийся и адаптирующийся в кранио-каудальном направлении, или все три поколения почек будут рассматриваться как самостоятельные образования, в обоих случаях будут наблюдаться — в отличие от печени, сердца и т. д. — разделение во времени и в пространстве органов, исполняющих подобные функции и чередующихся в процессе онтогенетического развития.

Важно, однако, то, что мезо- и метанефрос не замещаются строгим образом и сосуществуют одно время, образуя одновременно пару, состоящую из выделительного органа, который находится в разгаре деятельности и приспособлен к актуальным требованиям эмбрионального комплекса (мезонефрос), и другого органа (метанефрос), который существует топографически раздельно от первого, но еще не достиг своей специфической дифференциации. Затем эта пара проходит и фазу специфической функции, одновременной для обоих партнеров.

Объектом изучения была избрана гомеофункциональная пара, определенная в вышеуказанном смысле, а именно пара мезо- и метанефрос, так как, по-видимому, комплекс такого типа эмбриональных органов обладает особыми преимуществами для экспериментального изучения по отношению к «единым» органам типа сердца, печени и т. д.

Экспериментирование с такой парой органов могло бы привести к выработке методики для анализа онтогенических процессов, которые способствуют дифференциации эмбрионального органа в присутствии его гомеофункционального партнера — еще вполне достаточного для требований эмбрионального комплекса предшественника,

То, что в изучаемой паре различные морфо-функциональные онтогенетические фазы встречаются одновременно в разных, топографически разделенных органах. представляет более выгодные условия для экспериментирования.

В этой главе изучаются морфо-функциональные особенности первичной и вторичной почек в течение эмбрионального онтогенеза при помощи нескольких методов, способных выявить функциональные свойства этих двух поколений почек.

Предпринятые исследования позволяют утверждать, что существуют неопровержимые доказательства специфической функции в метанефросе зародыша 6-дневной инкубации. Скопление трипанового синего в клетках извитых канальцев мезонефроса в этой стадии отмечает существование специфически почечной функции; известно, что скопление трипана характерно для извитых канальцев позвоночных. Присутствие сферолитов мочевой кислоты иллюстрирует несомненное выделение этого вещества, начиная с 6-го дня инкубации.

Наличие щелочной фосфатазы в апикальной оболочке клеток извитых канальцев и гликогена в области апикального и базального полюсов тех же клеток доказывает, что с 5-го дня инкубации клетки извитых канальцев выполняют функцию всасывания глюкозы и депонирования ее под видом гликогена.

Этот период (5—6 дней инкубации) совпадает с появлением спонтанной флуоресценции в мезонефросе, которую можно выявить и изучить при помощи фильтрированных ультрафиолетовых лучей (Вуд).

Таким образом на 5—6-й день инкубации мезонефрос обладает неоспоримо характерными почечными функциями. В этом периоде мезонефрос в состоянии исполнять свои специфические функции. Этим функциям соответствует и картина хондриома,

который начинает укладываться палочкообразно на базальном полюсе клеток извитых канальцев.

В этой стадии метанефрос еще не представляет разделенного морфологического строения.

Поведение эпителиев по отношению к трипанового синего, реакция щелочной фосфатазы, собственная флуоресценция и картина хондриома позволяют утверждать, что почечные функции мезонефроса растут количественно, достигая плато между 8 и 9-м днем инкубации. В это время метанефрос намечается морфологически в виде канальцев, гистологическое строение которых четко контрастирует со строением мезонефроса: узкий просвет и малые базофильные клетки, в то время как в мезонефросе клубочки больших размеров, просвет канальцев широк и клетки ацидофильны.

В этой стадии усиленной деятельности мезонефроса, метанефрос сосуществует морфологически, не проявляя еще какую-либо из своих специфических функций: отсутствие скопления трипана, отсутствие сферолитов мочевой кислоты, фосфатазы, гликогена, собственной флуоресценции.

Гомеофункциональная пара мезо- и метанефроса характеризуется существованием одного партнера, находящегося в разгаре специфической деятельности, в то время как второй партнер находится в стадии морфологической дифференциации без проявления специфических функций. Это не означает полного отсутствия деятельности вторичной почки в данный момент. Дальнейшие исследования будут посвящены установлению типа функции, исполняемой этим органом в этом периоде. Она может качественно отличаться от специфических почечных функций.

Первое положительное функциональное проявление, которое появляется в метанефросе, это реакция щелочной фосфатазы и наличие гликогена в клетках извитых канальцев на 11-й день инкубации до появления других специфических функциональных проявлений. Следовательно, наличие щелочной фосфатазы — явление, предшествующее появлению специфических функций органа. Специфические функции появляются в следующем порядке: скопление трипановой сини, минимальное на 13-й день, становится явным на 14-й день инкубации, кристаллы мочевой кислоты появляются на 13-й день, слабая флуоресценция отмечается на 13-й день и становится явной на 14-й день. Внутривенное введение индигокармина на 14-й день инкубации позволяет произвести четкую одновременную оценку способности концентрирования и выделения мезо- и метанефротической пары. Эта способность явно выражена у первичной почки и лишь намечена у вторичной почки.

В течение этого периода отношение между первичной и вторичной почками изменяется по сравнению с первым описанным периодом. Оба партнера обладают теперь признаками специфической функции. Эти отличия проявляются различными картинами зерен трипанового синего и выделения мочевой кислоты. В мезонефросе наблюдаются большие зерна, а в метанефросе зерна малых размеров и палочкообразные. В первичной почке сферолиты больших размеров и размещены вереницей на протяжении выводных трубок, а во второй почке они меньших размеров, более плотные и в меньшем количестве.

Развитие специфической функции в метанефросе совпадает с началом обратного развития первичной почки, которое выражается инвазией макрофагов, скоплением в просвете трубки отторгнутого эпителия.

Вид мезо- и метанефротической пары указывает начало переходного периода в метаболической структуре эмбрионального комплекса, который проявляется морфофункционально в обоих сосуществующих почечных органах. Несмотря на то что первичная почка продолжает проявлять свои специфические функции, процесс перерождения становится все более и более выраженным, в то время как вторичная почка проявляет все более резкие функциональные признаки.

Кроме изучения гомеофункционального комплекса первично-вторичной почки, приведены наблюдения над другой гомеофункциональной парой, состоящей, с одной стороны, из эмбриональной печени, а, с другой стороны, из желточной оболочки, желточной энтодермы и подлежащего желтка, рассматриваемого как «переходная печень».

На пути исследования функциональных ступеней, проходимых разными органами до достижения специфической функции, «взрослого функционального порога», еще могут быть отмечены наблюдения над секреторными явлениями, наблюдаемыми в области слизистой желудка куриного зародыша, к 11-му дню инкубации, мерокринные выделения, находящиеся в связи с использованием белка зародышем в этом периоде.

Могут быть еще отмечены секреторные явления эмбрионального бронхиального эпителия, которые придают эмбриональному легкому сходство с экзокринной железой. Пока не известны судьба этих выделений и соответствующая предвзрослая функция эмбрионального легкого.

О МЕХАНИЧЕСКИХ ФУНКЦИЯХ НЕКОТОРЫХ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ОРГАНОВ

В течение развития зародыша возникают механические силы (давления, напряжения, тяги и т. д.), которые принимают активное участие в процессе развития. Таким образом автор отмечает наличие продольного напряжения, проявляющегося в теле куриного зародыша на 2-й день инкубации и находящегося в связи с дифференциацией аксиальных органов. Это напряжение способствует закрытию нервной трубки.

На 3-й день продольное напряжение сменяется поперечным, которое способствует, например, повторному открытию нервной трубки.

В этой главе изучаются эффекты, которые производят ритмические сокращения сердца, переданные соседней мезенхиме. Эти напряжения ведут к дифференциации нервных эластичных элементов.

Посредством ритмических растяжений вызывается реактивность мезенхимы, которая ведет к дифференциации эластичной ткани; эта дифференциация является адекватной реакцией.

Из изложенных исследований видно, что у куриного зародыша между 3 и 6-м днем инкубации развивается образование, состоящее из волоконцев, содержащих зернистость, обладающую красильными реакциями, характерными для эластичной ткани. Это образование, входящее в структуру аорто-пульмональной перегородки, приобретает связи с эластичными волоконцами стены аорты и легочной артерии и исчезает на 7-й день инкубации.

Описанное эластичное образование это своего рода преходящий эмбриональный орган, предшественник эластичной ткани больших сосудов. Это «первичное эластичное ядро» появляется в теле зародыша в единственном участке, существующем в данной стадии онтогенеза, который подвергнут ритмическому механическому напряжению. Эластичная ткань появляется впервые под видом «зерен», находящихся внутри волоконцев, еще недифференцированная в направлении эластичной ультраструктуры.

ЧАСТЬ V

ИССЛЕДОВАНИЕ НЕКОТОРЫХ ВЗАИМООТНОШЕНИЙ МЕЖДУ СОСТАВНЫМИ ЧАСТЯМИ ЭМБРИОНАЛЬНОГО КОМПЛЕКСА

Взаимодействия, возникающие между телом зародыша, с одной стороны, и белком яйца, желточным мешком, амнионом, аллантоисом и известковой скорлупой, с другой стороны, имеют большое значение для понимания эмбрионального онтогенеза куриного зародыша и в особенности для нахождения новых методов управления развитием онтогенеза.

После обсуждения разделения по стадиям онтогенеза куриного зародыша до вылупления, предложенного Г. А. Шмидтом и М. Р. Рагозиной, автор приступает и к изложению взаимоотношений между телом зародыша и желточным мешком.

Излагается описательное и экспериментальное исследование кроветворного органа желточного мешка. После того, как кровяные островки типа Вольфа и Пандера были мобилизованы в стенке желточного мешка, вдоль желточных сосудов появляются новые кроветворные очаги, образуя самый главный экстраэмбриональный кровеобразовательный орган.

Этот орган изучается путем введения туши в капиллярные сосуды реакции псевдопероксидаз кроветворных центров и путем прижизненного осмотра поверхности желточного мешка при помощи ультраопакового микроскопа.

Описывается развитие околоартериальных кроветворных капилляров, их связь с сетью желточных сосудов, образование кроветворных депо желточной энтодермы.

В экспериментальном отделе исследований эти кроветворные очаги подвергаются действию ультрафиолетовых лучей. Получаются некрозы кроветворных очагов и наблюдаются явления их восстановления. Отмечаются аномалии в расположении желточных сосудов,

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТА ПЕРЕРЫВА СОСУДИСТОЙ СВЯЗИ МЕЖДУ ТЕЛОМ ЗАРОДЫША И ЭКСТРАЭМБРИОНАЛЬНЫМ СОСУДИСТЫМ ПОЛЕМ

Кровяные островки Вольфа и Пандера могут развиваться, как известно, и в отсутствии тела зародыша или при экспериментальном перерыве сосудистой связи между сердцем зародыша и экстраэмбриональным сосудистым полем. Разумеется, такие сосудистые поля остаются вне кровообращения. Исследования, представленные в этой главе, занимаются, с одной стороны, рассмотрением гематопоэза в таких полях без кровообращения, а, с другой стороны, судьбой зародышевого тела, оставшегося без связи с экстраэмбриональным кроветворным аппаратом и с желточным кровообращением.

Поля без кровообращения могут наблюдаться до 10-го дня инкубации, и было возможно изучить поведение кровеобразовательных клеток, находящихся в этих условиях. Могли быть сделаны наблюдения над внедрением желточных зерен в просвет сосудов желточног кровообращения и над участием желточных элементов в желточном кровообращении.

Что касается самого тела зародыша, то можно установить, что рост в осевом направлении, дифференциация сомитов прогрессирует некоторое время и после прекращения желточного кровообращения. Описываются отклонения от нормы, наблюдаемые в этих условиях.

Автор считает кровяные поля без кровообращения полезной экспериментальной моделью для анализов активных факторов в процессе формирования и созревания кровяных клеток.

Метод «поля без кровообращения» может быть использован также для установления биологической ценности некоторых веществ, способных воздействовать на процесс кровотворения.

Приводится исследование аллантоисного кровообращения, в котором изучается функциональная структура аллантоисных сосудов при помощи введения туши и наблюдения in vivo.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОДЗАРОДЫШЕВОЙ ЖИДКОСТИ

Важными явлениями, которые в течение 2—3 дней меняют фундаментально отношения между белком и желтком яйца, являются образование и скопление подзародышевой жидкости. Образование этой жидкости начинается с первых часов инку-

бации и доходит до максимума между 3 и 6-м днем. В этой главе изучается период, начинающийся на 3-й день инкубации, в течение которого процесс достигает особенной интенсивчости. Были проведены три группы экспериментов:

а) Эксперименты, касающиеся установления количественных отношений между белком, желтком и подзародышевой жидкостью на разных стадиях развития.

б) Эксперименты, касающиеся происхождения подзародышевой жидкости из белка яйца.

в) Эксперименты по изменению процесса образования этой жидкости.

Приводятся экспериментальные доказательства, показывающие, что большая часть воды из подзародышевой жидкости происходит при перемещении воды из белка яйца в подзародышевую полость, в котором экстраэмбриональные оболочки играют активную роль.

В этом процессе играет важную роль и разница между осмотическим давлением желтка и осмотическим давлением белка яйца.

ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТАВА ПОДЗАРОДЫШЕВОЙ ЖИДКОСТИ

Были приведены химические и физико-химические анализы подзародышевой жидкости на разных стадиях развития. Результаты приведены в таблицах.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТА ВВЕДЕНИЯ ДОБАВОЧНОЙ ПОДЗАРОДЫШЕВОЙ ЖИДКОСТИ В АЛЛАНТОИСНЫЙ ПУЗЫРЬ

Перемещение воды из белка яйца в желточный мешок является у Sauropsida важным приспособлением к наземной жизни. Исследования, представленные в этой главе, занимаются изучением эффекта однократного введения 2 мл подзародышевой жидкости в полость аллантоисного пузыря куриного зародыша. Таким образом, зародыш получает излишек запаса воды и активных веществ этой жидкости.

Установлено, что у вылупившихся цыплят, обработанных таким способом, на 5-й день инкубации наблюдается в большинстве случаев прирост веса. Наблюдение нескольких последовательных поколений, полученных от экспериментальной группы, показало тенденцию к сохранению прироста в весе при вылупливании, что позволяет получить — путем отбора — исключительно хорошо развитых взрослых животных и последовательное увеличение в весе яиц.

ОБЪЯСНЕНИЕ РИСУНКОВ

Рис. 1. — Основы общего понятия об онтогенетическом комплексе. *a*, *b*, *c*, *d*, *e* — последовательные поколения в их материальной непрерывности. Наружная «оболочка» — непрерывность условий и факторов среды, необходимых для жизни и развития. Вертикальные стрелки — «актуальные» факторы, участвующие в онтогенезе. Горизонтальные стрелки — филогенетическая (историческая) последовательность факторов.

Рис. 2. — Схематическое изображение топографии составных элементов эмбрионального комплекса.

Рис. 3. — Схема, изображающая принцип систематизации на основании структурных отделов или уровней.

Рис. 4. — Различные этапы углубления: взаимоотношения между сферами онтогенетического комплекса.

Рис. 5. — Системы взаимоотношений при трансплантациях.

Рис. 6. — Виды питомника птиц.

Рис. 7. — Гнезда ловушки. Курятник с гнездами-ловушками.

Рис. 8. — Рабочий бокс в лаборатории по экспериментальной эмбриологии.

Рис. 9. — Рабочий стол для фенестрации яиц.

Рис. 10. — Схема простого овоскопа.

Рис. 11. — Укладывание яйца для фенестрации. x — кульминационный пункт в термостате.

Рис. 12. — Фенестрация яйца. Яйцо помещается на подставку, с отметкой «кульминационного пункта» на скорлупе. При помощи стилета делается точкообразное отверстие вблизи острого полюса яйца.

Рис. 13. — Извлекается шприцем 1 мл яичного белка.

Рис. 14. — Отверстие закрывается воском.

Рис. 15. — Вырезается напильником квадратный участок скорлупы.

Рис. 16. — Та же операция, проделанная при помощи зубоврачебной фрезы.

Рис. 17. — Удаляется квадратный участок скорлупы, но сохраняется нетронутой волокнистая оболочка яйца.

Рис. 18. — Обнаженная волокнистая оболочка яйца.

Рис. 19. — Рассечение волокнистой оболочки яйца.

Рис. 20. — Удаление волокнистой оболочки яйца.

Рис. 21. — Наложение рамы из парафина и воска вокруг созданного в скорлупе отверстия

Рис. 22. — Те же объяснения, что на рисунке 21.

Рис. 23. — Закрывание отверстия при помощи подогретого лезвия.

Рис. 24. — Фенестрированное яйцо закрыто.

Рис. 25. — Укладывание фенестрированных яиц в инкубатор.

Рис. 26. — Установка для наблюдения и оперирования.

Рис. 27. — Схематическое изображение микротермостата для яиц и микроскопа ультропак.

Рис. 28. — Ультропак и термостат для яиц.

Рис. 29. — Ультропак с приспособлением для фотографирования и микротермостат для яиц.

Рис. 30. — Способ наблюдения живого зародыша при помощи ультропака и термостата для яиц.

Рис. 31. — Внутреннее устройство микротермостата.

Рис. 32. — Установка О. Б. Лепешинской для прижизненного наблюдения зародыша при помощи ультропака (из книги О. Б. Лепешинской, Происхождение клеток из живого вещества, Изд. Академии РНР)

Рис. 33. — Установка Лепешинской и Лаписовой для прижизненного наблюдения поверхности эмбриональной пластинки (из книги О. Б. Лепешинской, Происхождение клеток из живого вещества, Изд. Академии РНР).

Рис. 34. — Прибор В. И. Сорокина для прижизненного исследования эмбриональной пластинки (из: Новые данные по проблеме развития клеточных и неклеточных форм живого вещества, Медгиз, 1954).

Рис. 35. — *a* — аппарат для исследования эмбриональных органов в фильтрованном ультрафиолетовом свете; *b* — облучение зародыша ультрафиолетовыми лучами.

Рис. 36. — Мезонефрос куриного зародыша 7-дневной инкубации. Фотограмма в флуоресцирующем свете.

Рис. 37. — Прижизненная окраска нейтральным красным эмбриональных клеток. Окрашены цитоплазматические включения, жировые капли.

Рис. 38. — Картина нервной трубки и сомитов. Живой зародыш через 50 часов от начала инкубации после прижизненной окраски нильским голубым.

Рис. 39. — Прижизненная окраска зародыша. Агар-агар как носитель красителя. Зародыш 3-дневной инкубации. Носитель красителя (агар-агар) вместе с нильским голубым наносится на все тело зародыша за исключением головы и части каудального отдела тела зародыша. Для наглядности размеры носителя красителя сильно увеличены. Фотограмма произведена через окошко, вырезанное в яичной скорлупе.

Рис. 40. — Тот же зародыш через 10 минут. Носитель красителя удален. Явный контраст между хорошо ограниченной, прижизненно окрашенной областью, и бледными, неокрашенными участками. Видны сомиты, нервная трубка, амниотические складки, сердечная трубка и т.д.

Рис. 41. — Тот же зародыш при большем увеличении. Видна тонкость очертания прижизненно окрашенных органов.

Рис. 42. — Схема «перенесенного» яйца.

Рис. 43. — Вид перенесенного зародыша на 7-й день инкубации. *a* — аллантоис покрывает зародыш, вокруг которого расположен амнион; началось погружение желточных сосудов. *b* — тот же зародыш при большем увеличении.

Рис. 44. — Влажная камера для прижизненного наблюдения и непрерывного смачивания зародыша и его сосудистого поля, извлеченного из яйца. Зародыш и его сосудистое поле укладываются на выпуклую поверхность часового стекла, находящегося на дне кристаллизатора. На крышке кристаллизатора видна установка для увлажнения.

Рис. 45. — Внутреннее устройство микротермостата для предметного стекла. Способ введения предметного стекла с культурой ткани или с живой эмбриональной пластинкой в микротермостат.

Рис. 46. — Микроскоп, снабженный фотографической камерой, отражающим зеркалом и микротермостатом для предметного стекла.

Рис. 47. — *a*, *b* и *c* — схематизация оперативной техники в зависимости от структурного отдела. Пути вмешательств для направления онтогенеза: I — вмешательства в структуру наружной среды; II — непосредственные вмешательства в область обмена веществ.

Рис. 48. — Изготовление стеклянных микроинструментов.

Рис. 49. — Протяжка стеклянной трубки.

Рис. 50. — Изготовление микроинструментов.

Рис. 51. — Изготовление крючка.

Рис. 52. — Крючок и тупой инструмент.

Рис. 53. — Изготовление тупого инструмента.

Рис. 54. — Установка для электротермокаутеризации. Переменное сопротивление, инструменты для каутеризации, подвижное операционное поле, бинокуляр с фотографической камерой и визиром «мифлекс» .

Рис. 55. — Переменное сопротивление и каутеры.

Рис. 56. — Установка для микроэлектролиза. Индифферентный электрод, снабжаемый равномерным током от батареи, держится в руке. Видны вольтметр и конвертер.

Рис. 57. — Установка для наблюдения и оперирования; способ держать рукой операционный инструмент.

Рис. 58. — *a* — Установка для оперирования при помощи неподвижного инструмента и подвижного поля. *b* — детали.

Рис. 59. — Установка для оперирования при помощи подвижного поля и неподвижного инструмента. Винты для маневрирования.

Рис. 60. — Установка для оперирования и электрокаутеризации. Инструменты монтированы на ручках манипулятора. Фотографическая камера находится на одном из окуляров бинокуляра. Боковое освещение.

Рис. 61. — Та же установка. Другой вид.

Рис. 62. — Детали из предыдущего рисунка. Микрокаутер изготовлен из константана. Электрические провода изолированы пластмассой.

Рис. 63. — Стеклянные крючки, монтированные на микроманипулятор.

Рис. 64. — Та же установка, что на предыдущих рисунках. Другой вид.

Рис. 65. — Детали из рисунка 64.

Рис. 66. — Установка для интраэмбриональных инъекций с неподвижной канюлей и с подвижным операционным полем. Фотографическая камера с визиром мифлекс, монтированная на один из окуляров бинокуляра позволяет делать некоторые снимки в течение операции.

Рис. 67. — Техника внутривенной инъекции в одну из аллантоисных вен. Яйцо 11-дневной инкубации, просвеченное; *CA* — воздушная камера; *V* — аллантоисные вены, видимые через скорлупу; V_1 — вена, видимая благодаря применению парафинового масла.

Рис. 68. — Способ проникновения в экстраэмбриональный целом при помощи вскрытия одной боковой амниотической складки.

Рис. 69. — Куриный зародыш 2-дневной инкубации. Прижизненная окраска нильским голубым. Видны нервная трубка, сомиты, слуховой пузырек, головная амниотическая складка, частично покрывающая голову. Операционная игла находится в положении для рассечения черепной амниотической складки.

Рис. 70. — Куриный зародыш в начале 3-го дня инкубации. Сфотографирован в живом состоянии. Прижизненная окраска нильским голубым. *AA* — место поперечного разреза, изображенного на рисунке 71.

Рис. 71. — Куриный зародыш в начале 3-го дня инкубации. Поперечный разрез, расположенный краниально от места выхода желточных артерий, приблизительно на уровне линии *AA*, представленной на рисунке 70. *a* — желточная оболочка; *b* — амниотические складки, образованные из экто- и мезодерма; *c* — экстраэмбриональный целом; *d* — интраэмбриональный целом; *e* — энтодерма; *f* — желточные сосуды; *g* — две аорты; *h* — хорда; *i* — нервная трубка; *j* — сомиты; *k* — мезодерма: соматоплевра и висцероплевра; *l* — покровная эктодерма; *m* — вольфов канал; *n* — сегментарный каналец вольфова органа (мезонефрос).

Рис. 72. — Операция миэлосцизиса. Прижизненная окраска амниотического дефекта.

Рис. 73. — Открытие амниотического дефекта.

Рис. 74. — Амнион снова открыт, его складки раздвинуты в стороны.

Рис. 75. — Операция миэлосхизиса. Нервная трубка вскрывается операционным инструментом.

Рис. 76. — Картина после завершения операции, представленной на рисунке 75.

Рис. 77. — Стадии операции миэлосхизиса (схема). Рассечение желточной оболочки.

Рис. 78. — Покровный эпидермис рассечен и удален. Операционная игла вскрывает нервную трубку.

Рис. 79. — Нервная трубка вскрыта.

Рис. 80. — Расположение обоих бинокулярных луп для проведения эмбриональных пересадок.

Рис. 81. — *a* — покров зародыша породы плимут, пересаженный на хориоаллантоисную оболочку; *b* — тот же трансплант через 48 часов.

Рис. 82. — *a*, *b* и *c* — сердце куриного зародыша 3-дневной инкубации, имплантированное на желточное сосудистое поле. *V* — желудочек. *B* — луковица. *MV* — желточная оболочка. *AV* — сосудистое поле. В *c* — выход миобластов под желточную оболочку.

Рис. 83. — Микроманипуляция. Справа видна стеклянная игла, слева — подогретая платиновая петля; оба инструмента монтированы на ручки микроманипулятора.

Рис. 84. — *a*, *b* и *c* — способ изготовления стеклянного острия для микроманипуляции.

Рис. 85. — Рассечение эритроцита.

Рис. 86. — Микроманипуляция. Общий вид установки. Масляная камера, фотографическая установка.

Рис. 87. — Детали масляной камеры.

Рис. 88. — Микроскоп лумипан, имеющий фотографическую установку, состоящую из камеры с зеркалом и визира мифлекс.

Рис. 89. — Установка для фотографирования живого зародыша in situ. Камера с отражающим зеркалом, кольца для удлинения, объектив, боковое освещение.

Рис. 90. — Электрофорез на бумаге. *a* — сыворотка куриного зародыша 14-дневной инкубации. *b* — белок яйца курицы породы леггорн, I — количественное определение (кривая получена при помощи электрокардиоскопа). II — фильтровальная бумага с белковыми фракциями после проявления.

Рис. 91. — Хроматография на бумаге (в двух измерениях). Аминокислоты из белкового гидролизата мышц 2-дневного цыпленка. *a* — Фенол/H_2O. *b* — бутанол(уксусная кислота)H_2O.

Рис. 92. — Схематическое изображение структурных отделов организма.

Рис. 93. — Зародыш 24-часовой инкубации. Микрофотограмма. 1 — желточная оболочка с гликогеном. 2 — желточные шары с гликогеном.

Рис. 94. — Зародыш 5-дневной инкубации. Микрофотограмма. 1—спинной мозг с гликогеном. 2 — миобласты с гликогеном.

Рис. 95. — Нервные симпатические клетки, содержащие большое количество гликогена, в состоянии миграции. Зародыш 5-дневной инкубации.

Рис. 96. — Печень с гликогеном зародыша 6-дневной инкубации.

Рис. 97. — Гликоген в печени зародыша 10-дневной инкубации; зарисовка при помощи камеры-клары.

Рис. 98. — Гликоген в печени зародыша 13-дневной инкубации; зарисовка при помощи камеры-клары.

Рис. 99. — Гликоген в печени зародыша 5-дневной инкубации под воздействием экстракта поджелудочной железы зародыша 12-дневной инкубации.

Рис. 100. — Перегруженная гликогеном печень под воздействием морфина у зародыша 13-дневной инкубации.

Рис. 101. — Реакция на щелочную фосфатазу в желточных шарах через 6 часов от начала инкубации.

Рис. 102. — Зародыш 2-дневной инкубации. Реакция на щелочную фосфатазу в среднем и промежуточном могзе, в зрительном бокале и в вентральной части спинного мозга.

Рис. 103. — Зародыш 17-дневной инкубации. Реакция на щелочную фосфатазу. 1 — область промежуточного мозга; 2 — область основание больших полушарий; 3 — область продолговатого могза.

Рис. 104. — Зародыш 13-дневной инкубации. Резко положительная реакция на щелочную фосфатазу. 1 — область спинного мозга; 2 — область спинномозговых узлов; 3 — область нервов, расположенных в области метанефроса; 4 — умеренно положительная реакция на уровне метанефроса.

Рис. 105. — Реакция на щелочную фосфатазу в печени зародыша 10-дневной инкубации.

Рис. 106. — Реакция на щелочную фосфатазу в печени зародыша 13-дневной инкубации.

Рис. 107. — Реакция на щелочную фосфатазу в области гипофиза зародыша 11-дневной инкубации.

Рис. 108. — Зародыш 12-дневной инкубации. Реакция на щелочную фосфатазу. 1 — область щитовидной железы; 2 — область околощитовидной железы; 3 — область вилочковой железы.

Рис. 109. — Зародыши 12-дневной инкубации. Реакция на щелочную фосфатазу в области щитовидной железы.

Рис. 110. — Зародыш 7-дневной инкубации. Реакция на щелочную фосфатазу в области надпочечника. 1 — положительная реакция.

Рис. 111. — Зародыш 12-дневной инкубации. Реакция на щелочную фосфатазу. 1 — на уровне мезонефроса; 2 — на уровне метанефроса.

Рис. 112. — Зародыш 48-часовой инкубации. Вид эмбриональных образований in situ на живом, без прижизненной окраски. 1 — сосудистое поле; 2 — желток; 3 — белок; 4 — скорлупа; 5 — ядро Пандеры; 6 — прозрачное поле; 7 — темное поле; 8 — голова зародыша.

Рис. 113. — Третий день инкубации, фотоснимок с живого зародыша. 1 — дорзальные аорты; 2 — желточное кровообращение (на живом); 3 — сердце; 4 — артериальные жаберные дуги; 5 — желточные вены; 6 — желточная артерия; 7 — крайняя пазуха; 8 — боковые желточные сосуды (справа и слева), 9 — желточные вены (передняя и задняя).

Рис. 114. — Четвертый день инкубации. Фотоснимок с живого зародыша. 1 — аллонтоисный пузырь; 2 — кардинальные вены, передняя и задняя; 3 — sinus reuniens Cuvier; 4 — сердце: 5 — предсердие; 6 — желудочек; 7 — продолговатый мозг; 8 — артериальные жаберные дуги; 9 — дорзальная аорта + задняя кардинальная вена; 10 — желточные сосуды; концевая пазуха (тело зародыша лежит на левом боку, покрытое амнионом).

Рис. 115. —Пятый день инкубации. Фотограмма живого зародыша. Тело зародыша видно через амнион. 1 — аллантоисный пузырек с его сосудами; 2 — желточные сосуды. Начало процесса погружения желточных артерий.

Рис. 116. — Эмбриональная пластинка приблизительно 19-часовой инкубации. Тотальный препарат (осмиевая кислота, глицерин). 1 — темное поле, почерневшее под влиянием осмиевой кислоты на желточные шары из желточного синцития; 2 — прозрачное поле имеет грушевидную форму; 3 — первичная полоска; 4 — узелок Гензена; 5 — головной отросток (виден через прозрачную эктодерму). Под прозрачным полем образовалась подзародышевая полость, содержащая подзародышевую жидкость.

Рис. 117. — Эмбриональная пластинка приблизительно 20-часовой инкубации. Тотальный препарат. Окраска кармином, просветление. 1 — первичная полоска относительно укорочена; 2—первичный узелок развивается здесь как имеющий эксцентричное сообщение с нервной бороздой; 3 — проамнион (область, расположенная перед головой и не имеющий мезодермы); 4 — нервные возвышения, между которыми видна нервная борозда (5); на дне этой борозды видна хорда (6) в виде тонкой линии; 7 — подголовной мешок.

Рис. 118. — Зародыш 24-часовой инкубации (4 дифференцированных сомита). Осмиевая кислота, глицерин. Тотальный препарат. 1 — темное поле с кровяными островками Вольфа-Пандера, 2 — прозрачное поле, 3 — нервные возвышения, 4 — нервная борозда, частично закрытая, образующая нервную трубку в области будущего ромбовидного мозга, 5 — передний нейропор, 6 — черепная амниотическая складка, 7 — первичная полоска постепенно укорачивается и располагается более каудально.

Рис. 119. — Зародыш 24-часовой инкубации. Тотальный препарат. Осмиевая кислота, глицерин. Пять дифференцированных сомитов. 1 — вход в подголовной мешок, 2 — черепная амниотическая складка, 3 — край входного отверстия в головную кишку (глотка) — зачаток сердечной трубки, 4 — нервные возвышения, 5 — хорда, 6 — сомиты, 7 — еще несегментированная мезодерма, 8 — область первичной полоски, 9 — прозрачное поле, 10 — темное поле.

Рис. 120. — Зародыш приблизительно 35—часовой инкубации. Осмиевая кислота, глицерин, тотальный препарат. 1 — темное поле с кровяными островками и синусоидами. 2 — прозрачное поле с кровяными синуосидами, 3 — черепная амниотическая складка, 4 — промежуточный мозг с первичными зрительными пузырьками, 5 — средний могз, 6 — ромбовидный мозг, 7 — головная эктодерма, 8 — передний нейропор, 9 — сердечная трубка, 10 — омфало-мезентеральная вена, 11 —вход в головную кишку, 12 — нервная трубка, 13 — сомиты, 14 — несегментированная мезодерма, 15 — боковая мезодерма (область про-и мезонефроса).

Рис. 121. — Зародыш приблизительно 35-часовой никубации. Осмиевая кислота, глицерин, тотальный препарат. Объяснения те же, что на предыдущем рисунке. Сердечная трубка выступает справа.

Рис. 122. — Срез эмбриональной пластинки 15-часовой инкубации. Эктодерма образована из многослойного эпителия. Первичная полоска, от которой отходят налево и направо мезодерма. Здесь еще не произошла дифференциация энтодермы от массы мезодермы.

Рис. 123. — Срез эмбриональной пластинки 15-часовой инкубации. Первичная полоска (непрерывность между экто-, мезо-и энтодермой). Мезодерма (расположена по обе стороны первичной полоски и под эктодермой). Энтодерма. Желток.

Рис. 124. — Срез эмбриональной пластинки 15-часовой инкубации. Эктодерма, мезодерма, энтодерма, желток, первичная полоска; клетки мезодермы образуют мезенхимальную пространственную сеть. Мезо-и энтодерма четко отграничены от желтка.

Рис. 125. — *a*,*b*, *c* и *d*— срезы эмбриональной пластинки 24-часовой инкубации. Первичная борозда и область первичной полоски. 1 — экто-, мезо-и энтодерма на уровне прозрачного поля, 2 — экто-, мезо- и энтодерма на уровне темного поля; зародышевый вал темного поля; желточная оболочка (фрагментированная — артефакт), *d*— превращение энтодермы в области темного поля в желточный синцитий (сеть энтодермальных клеток, в просветах которой находятся желточные элементы, среди которых различаются сингранулы, мегасферы, желточные шары с протоплазматическим центром и т д.). Тесная связь между кровяными островками (*i*↓) и желточным синцитием.

Рис. 126. — *a b* и *c* — срезы эмбриональной пластинки 24-часовой инкубации. Те же детали, что на рисунке 125. Первичная борозда. Область первичной полоски. Экто-, мезо-и энтодерма; эктодерма содержит желточные элементы.

Рис. 127. — Зародыш 48-часовой инкубации. Прижизненная окраска нильским голубым. Фотограмма с живого зародыша *a* — начало поворота головы. Черепная амниотическая складка; слуховой пузырек (остальные детали те же, что на рисунках 120 и 121), *b* — та же картина с операционным инструментом.

Рис. 128. — Эмбриональная пластинка приблизительно 35-часовой инкубации. Тотальный препарат, реакция псевдопероксидаз (бензидин, перекись водорода, глицерин). Темное поле, прозрачное поле; эмбриональное поле. В области темного поля кровяные островки Вольфа-Пандера, выявленные благодаря реакции псведопероксидаз.

Рис. 129. — Те же объяснения, что и на рисунке 128.

Рис. 130. — Зародыш 4-дневной инкубации.

Рис. 131. — Зародыш 5-дневной инкубации.

Рис. 132. — Зародыш 6-дневной инкубации.

Рис. 133. — Зародыш 7-дневной инкубации.

Рис. 134. — Зародыш 8-дневной инкубации.

Рис. 135. — Зародыш 9-дневной инкубации.

Рис. 136. — Зародыш 10-дневной инкубации.

Рис. 137. — Зародыш 11-дневной инкубации.

Рис. 138. — *a* — третий день инкубации, *b* — тот же срез при большом увеличении. 1 — передний мозг, 2 — ромбовидный мозг (имеет тонкую покрышку), 3 — слуховой пузырек, 4 — зрительный бокал, 5 — артериальные жаберные дуги, 6 — передняя кардинальная вена, 7 — глотка, 8 — гипофиз, 9 — жаберная щель, 10 — первая жаберная дуга; экстраэмбриональная желточная экто-, мезо- и энтодерма; амнион; серозная оболочка.

Рис. 139. — *a* — куриный зародыш. Начало 3-го дня инкубации. Поперечный разрез через среднюю часть туловища ведет в экстраэмбриональный целом; доступ к интраэмбриональному целому. *в* — тот же разрез при большем увеличении. 1 — нервная трубка, 2 — сомиты, 3 — хорда, 4 — вольфово тело, 5 — аорта, 6 — эктодерма, 7 — энтодерма, 8 — интраэмбриональный целом, 9 — экстраэмбриональный целом, 10 — желточные сосуды, 11 — амниотические складки, 12 — желточная оболочка.

Рис. 140. — Продольный срез на уровне нервной трубки (импрегнация серебром). Эпендимальный канал; межпозвоночный узел (*GR*); сомиты (*S*).

Рис. 141. — Конец 4-го дня инкубации. Импрегнация серебром. Парасаггитальный разрез. 1 — слуховой пузырек, 2 — ромбовидный мозг, 3 — эндолимфатический проток, 4 — фациально-акустический комплекс, 5 — каменистый узел (языкоглоточного нерва), 6 — пучковидный узел (блуждающего нерва), 7 — спинной мозг, 8 — хорда, 9 — симпатический нерв, 10 — верхняя кардинальная вена, 11 — предсердие, 12 — верхняя конечность, 13 — глаз, 14 — подъязычный нерв, 15 — первая жаберная дуга, 16 — первая жаберная щель, 17 — вторая жаберная дуга, 18 — вторая жаберная щель, 19 — третья жаберная дуга, 20 — третья жаберная щель, 21 — четвертая жаберная дуга, 22 — четвертая жаберная щель, 23 — амнион.

Рис. 142. — Конец 4-го дня инкубации. Парасаггитальный разрез. Импрегнация серебром. 1 — ромбовидный мозг, 2 — спинной мозг, 3 — межпозвоночный узел, 4 — склеротом, 5 — хорда, 6 — аорта, 7 — третья, четвертая и шестая аортальная дуга, 8 — щитовидная железа, 9 — предсердие, 10 — печень, 11 — легкое (главный бронх), 12 — целом (плевроперитонеальная полость), 13 — тройничный нерв, 14 — фациально-акустический комплекс, 15 — слуховой пузырек, 16 — первая и вторая жаберная дуга, 17 — ротовой синус, 18 — амнион.

Рис. 143. — Конец 4-го дня инкубации. Сагиттальный разрез. Импрегнация серебром. Те же объяснения, что на предыдущем рисунке. *a* — спинально-вагусный комплекс, *b* —подъязычный нерв, *c* — передняя ветвь спинального нерва.

Рис. 144. — Конец 4-го дня инкубации. Сагиттальный разрез. Импрегнация серебром. 1 — спинальный нерв, 2 — видимые корешки подъязычного нерва, 3 — передние корешки спинномозговых нервов с их разветвлениями для покровов, 4 — сомиты, 5 — ромбовидный мозг, 6 — слуховой пузырек, 7 — передняя кардинальная вена.

Рис. 145. — Поперечный срез головы куриного зародыша 6-дневной инкубации (импрегнация серебром). 1 — ромбовидный мозг, 2 — передний мозг, 3 — глаз, 4 — слуховой пузырек с эндолимфатическим протоком, 5 — гассеров узел.

Рис. 146. — Разрез зародыша и смежных экстраэмбриональных оболочек 50-часовой инкубации. *a* — тело зародыша, *b* — амнион, *c* — серозная оболочка, *d* — желточная энтодерма с желточными сосудами и экстраэмбриональная эктодерма (*e*).

Рис. 147. — Поперечный разрез на уровне нижних конечностей через тело куриного зародыша 6-дневной инкубации. Импрегнация серебром. 1 — спинной мозг, 2 — межпозвоночный узел, 3 — сомит, 4 — хорда, 5 — аорта, 6 — симпатический нерв, 7 — ветви к периаортальному сплетению и к надпочечнику, 8 — зачаток метанефроса, 9 — мезонефрос, 10 — вольфов канал, 11 — брыжейка, 12 — тонкая кишка, 13 — брыжеечный узел, 14 — целом, 15 — аллантоис (корень), 16 — пупочная артерия, 17 — задняя кардинальная вена.

Рис. 148. — Куриный зародыш, фиксированный на 3-й день инкубации, после инъекции китайской туши в подзародышевую полость на второй день инкубации. Тушь была фагоцитирована в области зародышевого вала. Обзорный препарат.

Рис. 149. — Те же объяснения, что на рисунке 148. Отсутствие фагоцитоза прозрачного поля.

Рис. 150. — Срез куриного зародыша на 3-й день инкубации и смежного сосудистого поля. Иньекция туши в подзародышевую полость. Фагоцитоз туши желточной энтодермой.

Рис. 151. — Деталь рисунка 150. Инъекция китайской туши в подзародышевую полость. Фагоцитоз туши желточной энтодермой. Адсорбция туши на поверхности желточных шаров.

Рис. 152. — Инъекция китайской туши в подзародышевую полость. *a* — нормальная желточная энтодерма на 3-й день инкубации; обзорный препарат; фиксация осмиевой кислотой; хранение в глицерине. *b* — адсорбция зерен туши, фагоцитированных клетками желточной энтодермы на поверхности желточных шаров; Обзорный препарат, просветленный глицерином. *c* — детали из *b*.

Рис. 153. — Эмбриональная пластинка форели *(Fario trutta)*. Дискоидальная сегментация. Отношения сегментированного диска и подлежащего желтка. Начальная стадия образования подзародышевой полости.

Рис. 154. — *a*, *b* и *c* — сегментация яйца тритона. Тотальная, неравномерная сегментация.

Рис. 155. — *a* — бластомеры тритона. Каждая бластомера обладает своим «запасом» желточных пластинок. Центральное просветление — ядро. *b* — срез головастика в начале его свободной личиночной жизни. Мезонефротическая трубка и кровяные клетки. Каждая клетка обладает и в этой стадии запасом желтка.

Рис. 156. — Головастик тритона. Поперечнополосатая мускулатура с запасом желтка.

Рис. 157. — Головастик лягушки в начале его свободной личиночной жизни. На срезах *a*, *b* и *c* видно начало потребления запасов желтка в области нервной трубки и дорзальной мускулатуры.

Рис. 158. — Поперечный срез туловища куриного зародыша 3-дневной инкубации. 1 — интраэмбриональный целом, 2 — экстраэмбриональный целом, 3 — нервная трубка (хорда), 4 — аорта, 5 — энтодерма, 6 — эктодерма, 7 — мезодерма с сомато- и висцероплеврой, 8 — сомиты, 9 — вольфово тело, 10 — желточная оболочка; желточные сосуды, 11 — боковые амниотические складки.

Рис. 159. — Эктодерма баеровской серозной оболочки. Осмиевая кислота, глицерин, фазово-контрастная оптика, иммерсия. Жировые зерна образуют типичные околоядерные «венцы».

Рис. 160. — Интерстициальная инъекция разведенной китайской туши в куриный зародыш 4-дневной инкубации. Макрофаги, фагоцитирующие зерна туши. Тушь находится среди жировых капель, под видом скоплений обычно круглой формы.

Рис. 161. — *a*, *b* и *c* — хориоаллантоисная оболочка (10-дневной инкубации). Фагоцитоз туши макрофагами. Глицерин, иммерсия, фазово-контрастная оптика, круглые скопления зерен туши, расположенные, по-видимому, в пищеварительных вакуолях.

Рис. 162. — *a* и *b* — энтодерма из области прозрачного поля. Куриный зародыш 4-дневной инкубации. Осмиевая кислота, глицерин. Тотальный препарат. Околоядерные венцы из жировых капель.

Рис. 163. — Край зародышевого вала и смежное прозрачное поле 4-дневной инкубации. Осмиевая кислота, глицерин. Тотальный препарат. Клетки желточной энтодермы, нагруженные желточными шарами (внизу и слева). Клетки прозрачного поля содержат околоядерные жировые «венцы».

48. — c. 1778

Рис. 164. — *a* — инъекция китайской туши в центральный канал спинного мозга куриного зародыша 4-дневной инкубации. Лишь через 3 дня в области тонкой покрышки ромбовидного мозга наблюдается редкий фагоцитоз туши, *b* — деталь из *a*.

Рис. 165. — *a* и *b* — макрофаги куриного зародыша 10-дневной инкубации. Трансаллантоисная прижизненная окраска трипановым синим. Между жировыми каплями видны зерна трипанового синего.

Рис. 166. — Макрофаги куриного зародыша. *a* — жировые капли, *b* — изображение на темном поле.

Рис. 167. — Макрофаг куриного зародыша. Прижизненная окраска нильским голубым. Окрашены жировые капли.

Рис. 168. — *a* — эмбриональный покров голубя, трансплантированный на хориоаллантоисную оболочку куриного зародыша. Видна дифференциация жировых долек. *b* и *c* — детали этих жировых долек.

Рис. 169. — *a* и *b* — эпителий амниона куриного зародыша. Расположение фагоцитированных зерен туши сходно с расположением типичных венцов из жировых капель.

Рис. 170. — Меланобласт, происходящий от породы плимут через 12 дней после пересадки покрова породы плимут на зародыш леггорн. Рядом два макрофага от породы леггорн, содержащие фагоцитированный пигмент чужеродной породы.

Рис. 171. — Нормальные покровные меланобласты зародыша породы плимут 9-дневной инкубации. Рядом макрофаги, в которых фагоцитируют изолированные фрагменты разветвлений меланобластов. Округлые меланобласты.

Рис. 172. — Фагоцитоз собственного пигмента в покрове зародыша породы плимут 7-дневной инкубации.

Рис. 173. — Фагоцитоз собственного пигмента в покрове куриного зародыша породы плимут 13-дневной инкубации.

Рис. 174. — *a* и *b* — меланобласты зародыша породы плимут 13-дневной инкубации; *c* — макрофаги в том же покрове с фагоцитированным пигментом.

Рис. 175. — *a* и *b* — макрофаги в эмбриональном покрове куриного зародыша породы плимут, расположенные вблизи меланобластов. Фагоцитированный меланический пигмент в пищеварительных вакуолях (7-й день инкубации).

Рис. 176. — *a* — эмбриональный покров породы плимут (10-й день инкубации) в тканевой культуре. Среда: гепаринированная плазма и эмбриональный экстракт той же породы; 48-часовая культура. Участок мезенхимального роста. Эмиграция макрофагов частично нагруженных фагоцитированным меланическим пигментом *b* и *c* — детали из *a*.

Рис. 177. — Тканевая культура эмбрионального покрова породы плимут. Эмигрировавшие макрофаги, содержащие фагоцитированный меланический пигмент среди жировых капель. Волнистые оболочки.

Рис. 178. — *a* и *b* — тканевая культура эмбрионального покрова породы плимут. Эмиграция меланобластов в зону роста.

Рис. 179. — *a* — культура эмбрионального покрова породы плимут. Макрофаги, содержащие фагоцитированный меланический пигмент; *b* — «встреча» между меланобластами и макрофагом.

Рис. 180. — *a*, *b* и *c* — культура эмбрионального покрова породы леггорн 9-дневной инкубации; 48-часовая культура. Прибавление разбавленной китайской туши. Фибробласты фагоцитируют тушь.

Рис. 181. — *a* — культура хориоаллантоисной оболочки зародыша 11-дневной инкубации и прибавление разбавленной туши к питательной среде. Множественный выход макрофагов, фагоцитировавших тушь. Макрофаги частично соединились посредством протоплазматических отростков. *b* и *c* — детали из *a*.

Рис. 182. — Тканевая культура эмбрионального покрова породы леггорн с прибавлением туши. Фагоцитоз туши фибробластами.

Рис. 183. — *a* — фрагмент хориоаллантоиса породы леггорн 11-дневной инкубации, культивированный в течение 48 часов в гепаринированной плазме. Широкие эпителиальные пластинки. Фагоцитоз туши эпителиальными клетками. *b* и *c* — детали.

Рис. 184. — Эпителиальная пластинка из культуры хориоаллантоисной оболочки. Фагоцитоз туши, введенной в среду эпителиальными клетками.

Рис. 185. — Культура эмбрионального покрова породы леггорн с прибавлением каолина и пигмента сетчатки к питательной среде. Макрофаги фагоцитируют кусочки каолина и палочки пигмента сетчатки.

Рис. 186. — *a* — многослойность и мальпигиево превращение хориоаллантоисного эпителия (раздражитель — мышиная саркома); *b* — четко видны межклеточные пространства, протоплазматические мостики.

Рис. 187. — *a* — ороговение хориоаллантоисного эпителия (раздражитель — туберкулезная ткань морской свинки); *b* — проникновение эпителиальных шаров в толщу хориоаллантоисной оболочки (раздражитель — мышиная саркома); *c* — ороговение хориоаллантоисного эпителия (прижизненный вид in situ). Раздражитель — селезенка мыши.

Рис. 188. — *a* — саркома белой мыши, трансплантированная на хориоаллантоисную оболочку на 8-й день инкубации. Прижизненная картина на 15-й день инкубации; *b* — саркома белой мыши, трансплантированная на хориоаллантоисную оболочку на 8-й день инкубации. Вид нижней поверхности трансплanta на 16-й день инкубации. Видна васкуляризация подсадки; *c* — саркома Роуса, трансплантированная на хориоаллантоисную оболочку на 8-й день инкубации. Прижизненная картина на 15-й день инкубации.

Рис. 189. — *a* — трансплантация саркоматозной ткани (белая мышь) на хориоаллантоисную оболочку. Резкая эпителиальная реакция хориоаллантоисной оболочки с образованием ороговевших шаров; *b* — та же картина при большем увеличении; *c* — трансплантация саркоматозной ткани (белая мышь) на хориоаллантоисную оболочку. Некробиоз поверхностной части трансплантата. Живая опухолевая ткань в соприкосновении с ороговевшими шарами хориального эпителия. Мальпигиево перерождение вокруг подсадки.

Рис. 190. — *a* — трансплантация саркоматозной ткани белой мыши на хориоаллантоисную оболочку. Детали: роговые шары и инфильтративное разрастание эпителия к саркоматозной массе; *b* — хориальные сосуды проникают среди роговых шаров в подсаженную опухолевую ткань.

Рис. 191. — *a* — саркома Роуса, привитая на тело зародыша 3-дневной инкубации, который был зафиксирован на 12-й день инкубации; *b* и *c* — детали из *a*; *b* — резкая эпителиальная реакция; *c* — эпителиальная реакция.

Рис. 192. — Саркома Роуса, культивированная на хориоаллантоисной оболочке.

Рис. 193. — Саркома белой мыши, привитая на тело куриного зародыша 3-дневной инкубации. Фиксация была произведена на 12-й день инкубации. Опухоль инфильтрирует мускулатуру хозяина; со стороны хозяина не видно никакой реакции.

Рис. 194. — Отдельные бугорки, расположенные на хориоаллантоисной оболочке, на 9-й день после инфицирования взвесью туберкулезных палочек.

Рис. 195. — Резкая реакция со сливающимися узелками хориоаллантоисной оболочки на 10-й день после инфицирования путем подсадки туберкулезного органа.

Рис. 196. — Хориоаллантоисная оболочка. Начальная стадия инфильтрата на 10-й день после инфицирования путем подсадки туберкулезного органа.

Рис. 197. — Хориоаллантоисная оболочка. Более развитый узелок на 10-й день после инфицирования путем подсадки туберкулезного органа.

Рис. 198. — Массивный узелок с центральным некротическим участком на хориоаллантоисной оболочке на 10-й день после инфицирования путем подсадки туберкулезного органа.

Рис. 199. — Хориоаллантоисная оболочка на 10-й день после инфицирования путем подсадки туберкулезного органа. Симпласты, расположенные лучеобразно вокруг некротического участка.

Рис. 200. — Метаплазия хориоаллантоисного эпителия под видом утолщений и эпителиальных шариков, частично ороговевших, на 11-й день после инфицирования эмбриональной тканью, омытой взвесью туберкулезных палочек.

Рис. 201. — Эпителиальный островок, образованный разрастанием хориоаллантоисного эпителия, на 10-й день после инфицирования путем подсадки туберкулезного органа.

Рис. 202. — Куриный зародыш 15-дневной инкубации. Узелки, расположенные около его середины и выступающие под покровом дорзальной области; они развились вследствие инфицирования тела зародыша (подсадка эмбриональной ткани, омытой взвесью туберкулезных палочек, введенной путем миэлосхизиса); 12-й день после инфицирования.

Рис. 203. — Узелок, изображенный на рисунке 202 при большем увеличении.

Рис. 204. — Поперечный срез на уровне дорзальной области куриного зародыша 14-дневной инкубации. Туберкулезный узелок покровов на 11-й день после инфицирования тела зародыша путем подсадки ткани, омытой взвесью туберкулезных палочек.

Рис. 205. — Поперечный срез на уровне дорзальной области куриного зародыша 17-дневной инкубации. Туберкулезный узелок с центральным некрозом, полученный путем непосредственного инфицирования тела зародыша.

Рис. 206. — Узелок, изображенный на рисунке 205 при большем увеличении.

Рис. 207. — Туберкулезный узелок с центральной казеификацией. Непосредственное инфицирование тела зародыша путем подсадки органа, омытого взвесью туберкулезных палочек; 10-й день после инфицирования.

Рис. 208. — Непосредственное инфицирование тела зародыша путем подсадки ткани, омытой взвесью туберкулезных палочек; 13-й день после инфицирования. Специфичный воспалительный инфильтрат на месте подсадки и на уровне позвоночного канала (менингит).

Рис. 209. — Менингеальный инфильтрат, изображенный на рисунке 208.

Рис. 210. — Подкожный воспалительный узелок, расположенный под покровным эпителием. Отсутствие эпителиальных реакций и беспрепятственное развитие сосочков эмбриональных перьев. Непосредственное инфицирование тела зародыша путем подсадки ткани, омытой взвесью туберкулезных палочек; 11-й день после инфицирования.

Рис. 211. — Массивные узелки частично в состоянии творожистого распада, расположенные на хориоаллантоисной оболочке. Введение взвеси туберкулезных палочек в амниотическую полость; 15-й день после инфицирования.

Рис. 212. — Схематическое изображение действия сил тяги. *a* — продольное и *b* — поперечное действие на нервную трубку. Модель: надрезанная резиновая трубка. Разрез имеет тенденцию закрыться в *a* и становится зияющим в *b*.

Рис. 213. — Куриный зародыш 9-дневной инкубации. Экспериментальный миэлосхизис на 6-й день после вмешательства. Открытая нервная пластинка.

Рис. 214. — Куриный зародыш 9-дневной инкубации. Нервная трубка открыта в двух местах на 6-й день после вмешательства.

Рис. 215. — Куриный зародыш 18-дневной инкубации. Экспериментальный миэлосхизис начиная с третьего дня инкубации. Экстериоризация дорзо-поясничного отдела спинного мозга.

Рис. 216. — Миэлосхизис на 3-й день после операции (зародыш 5-дневной инкубации). Развернутая нервная пластинка. Эпендима продолжается покровным эпителием. Спинномозговые узлы сдвинуты под нервную пластинку. Сомиты вывернуты латерально. Мезенхимальная полоска между нервной пластинкой и склеротомом на дорзальном участке туловища, отделенном бороздой от переднебокового участка, результат разворачивания нервной пластинки.

Рис. 217. — Зародыш, изображенный на рисунке 216. Общий вид среза.

Рис. 218. — *a* — миэлосхизис на 3-й день после вмешательства. Шейная область. Развернутая нервная пластинка. Мезенхимальная полоска между пластинкой и склеротомом. Деформация сомитов. *b* — миэлосхизис на 3-й день после вмешательства. Нервная пластинка начинает отделяться от ее опоры. Явления демаркации нервной пластинки.

Рис. 219. — Деталь рисунка 218. Миэлосхизис на 3-й день после операции. Глубокая борозда, отграничивающая дорзальный участок туловища.

Рис. 220. — Миэлосхизис на 5-й день после вмешательства. Частичное вскрытие нервной трубки.

Рис. 221. — Сравнение между отношениями нервной трубки в норме и при экспериментальном миэлосхизисе. *a* — экспериментальный миэлосхизис. Мезенхимальная полоска, отделяющая нервную пластинку от склеротома. *b* — контроль (импрегнация серебром).

Рис. 222. — Куриный зародыш. Начало 3-го дня инкубации. Поперечный разрез среднего отдела туловища. Нервная трубка; сомиты; хорда; вольфовы каналы; аорты; эктодерма; энтодерма; интра- и экстраэмбриональный целом; желточные сосуды; боковые амниотические складки; желточная оболочка.

Рис. 223. — Куриный зародыш в начале 3-го дня инкубации. Поперечный срез на уровне каудального отдела туловища. Обозначения те же, что на рисунке 222.

Рис. 224. — *a* — куриный зародыш. Спонтанный миэлосхизис. Сращение нижних конечностей в «аксиальном» положении. *b* — тот же случай; раздвоение эпендимального канала.

Рис. 225. — *a* — общий вид среза поврежденного участка в случаях spina bifida у куриного зародыша *b* — детали. Ненормальный нервный ствол, расположенный в срединной плоскости, и деформация тела позвонка, находящегося в связи с этим стволом.

Рис. 226. — *a* и *b* — свежий, незафиксированный препарат 2-месячного человеческого зародыша; *c* и *d* — вид зародыша сзади: дорзальное сращение нервной трубки, вверху ромбовидный мозг со своей тонкой покрышкой.

Рис. 227. — Новорожденный ребенок с пояснично-крестцовой spina bifida.

Рис. 228. — Новорожденный ребенок. Краниорахисхизис. Анэнцефалия. *a* — вид сзади и *b* — вид спереди.

Рис. 229. — Схематическое изображение операции термокоагуляции спинного мозга. Микрокаутер введен в открытую нервную трубку.

Рис. 230. — *a* и *b* — зародыш 6-дневной инкубации на 3-й день после коагуляции спинного мозга на уровне нижних конечностей. Уменьшение расстояния между верхними и нижними конечностями (путем сгибания, лордоза и сокращения); рядом — контроль.

Рис. 231. — *a* и *b* — деформации, развивающиеся на 12-й день инкубации на уровне нижних конечностей оперированных зародышей.

Рис. 232. — *a* — зародыш 15-дневной инкубации, которому произвели каутеризацию спинного мозга на уровне нижних конечностей на 3-й день инкубации. Развилось порочное, когтевидное положение. Движения конечностей присущие этому возрасту отсутствуют. *b* — зародыш 16-дневной инкубации, которому произвели каутеризацию спинного мозга на уровне верхних конечностей. Нижние, нормально развитые конечности производят движения, присущие этому возрасту.

Рис. 233. — *a* — гемикаутеризация спинного мозга куриного зародыша. *b* и *c* — нейробласты, расположенные по ходу новообразованного ствола.

Рис. 234. — Гемикаутеризация спинного мозга (после миэлосхизиса).

Рис. 235. — *a*, *b* и *c* — гемикаутеризация спинного мозга (после миэлосхизиса); новообразованный нервный ствол, идущий к части, в которой отсутствует спинной мозг.

Рис. 236. — *a* — экспериментальный миэлосхизис, оставшийся незакрытым. Зародыш 20-дневной инкубации с экспериментальным миэлосхизисом, произведенным на 3-й день инкубации. Поперечное разрушение спинного мозга путем термокаутеризации на 4-й день инкубации. Видны оба конца спинного мозга между которыми образовался мостик. *b* — продольный срез вышеуказанного мостика у зародыша 7-дневной инкубации.

Рис. 237. — Зародыш 7-дневной инкубации, подвергнутый каутеризации на 3-й день инкубации. Фронтальный срез нервной трубки. Нервная трубка разрушена на протяжении приблизительно 8 сегментов. Видна восстановленная часть нервной трубки и спинномозговой дефект (на этом уровне позвоночный канал пуст). Образовался мостик между обоими концами спинного мозга, имеющий вид пучка нервных волокон. В восстановленной части образовались многочисленные эпендимальные каналы (тератоидный вид). Богатая сосудистая сеть, расположенная в восстановленной части и вокруг этой части спинного мозга.

Рис. 238. — *a* и *b* — детали рисунка 237. Продольный срез соединительного ствола и новообразованные эпендимальные каналы.

Рис. 239. — Детали рисунка 237. Неорганизованная структура восстановленного спинного мозга. Новообразование эпендимальных каналов. Относительно крупные внутриспинномозговые сосуды.

Рис. 240. — *a* — полное удаление спинного мозга (произведенное на 3-й день инкубации) на уровне нижних конечностей. Восстановление покровов. Резко положительная реакция на щелочную фосфатазу. *b* — анормальный вид корешков позвоночной дуги. Спинной мозг замещен мезенхимальной рыхлой тканью и несколькими сосудами.

Рис. 241. — Спинной мозг во втором периоде (после 12-дневной инкубации).

Рис. 242. — *a*, *b*, *c*, *d* и *e* — зародыш с миэлосхизисом вблизи участка, подвергнутого электрокоагуляции; от спинного мозга отделяется нервный ствол, проходящий через позвоночник на уровне корешка дуги. *f* — детали. Нервный ствол в просвете канала, проходящего через хрящевую ткань тела позвоночника.

Рис. 243. — Зародыш 7-дневной инкубации с полностью разрушенным спинным мозгом на уровне нижних конечностей на протяжении 10 сегментов. Поперечный срез, импрегнация серебром. Закрытие покровного дефекта и отсутствие спинного мозга. Изолированный спинной узел со своим стволом афферентных волокон. Вместо спинного мозга видны в поперечном разрезе несколько нервных стволов, которые, направляясь латерально, пополняют спинномозговой нерв, посылая ему двигательные волокна. *a* — типичное расположение переднего корешка. Регенерация передних корешков путем образования «конского хвоста». *b* — сравнение с разрезом, произведенным через нормальный зародыш. *c* — два спинномозговых узла, оставшихся изолированными.

Рис. 244. — *a* и *b* — деталисунка 243. Передний корешок в состоянии регенерации.

Рис. 245. — *a* и *b* — топографическое расположение и разветвление спинномозгового нерва зародыша, изображенного на рисунке 243. Отсутствие спинномозгового сегмента. Передний корешок в состоянии регенерации.

Рис. 246. — *a* — расположение и толщина спинномозгового нерва в норме. *b* — спинномозговой нерв зародыша подвергнутого операции.

Рис. 247. — *a* и *b* — нервные сплетения конечности, принадлежащей к оперированной области.

Рис. 248. — *a*, *b* и *c* — зародыш 6-дневной инкубации, которому произвели каутеризацию спинного мозга на уровне нижних конечностей на 3-й день инкубации. Порок развития нижних конечностей, имеющих конический вид.

Рис. 249. — Зародыш 11-дневной инкубации, подвергнутый каутеризации спинного мозга на уровне верхних конечностей. Конический вид верхней конечности. *a* — вид сзади. *b* — вид сбоку. с — детали.

Рис. 250. — *a* и *b* — зародыш 10-дневной инкубации, подвергнутый каутеризации спинного мозга на уровне нижних конечностей на 3-й день инкубации. Рана покровов зажила полностью. Образовался, однако, дефект правой передне-боковой стенки на уровне вольфова тела. *c* — тот же зародыш, вид сбоку. Дефект передне-боковой стенки туловища, через который выступает вольфово тело. Нижние конечности, нормально развитые.

Рис. 251. — Полное разрушение спинного мозга. Кажущееся удвоение и утроение хорды на уровне оперированной области (образование складок).

Рис. 252. — Зародыш 7-дневной инкубации. Экспериментальная анэнцефалия. *a* и *b* — электрокоагуляция мозговых пузырьков через 51 час от начала инкубации. Выявлена щелочная фосфатаза. Реакция на фосфатазу достигает максимальной интенсивности на уровне продолговатого мозга (*a*) и спинного мозга (*b*). Контрольный зародыш (*c*) того же возраста. Реакция на фосфатазу незначительна на уровне спинного мозга, отрицательна на уровне продолговатого мозга, максимальна на уровне промежуточного мозга.

Рис. 253. — Куриный зародыш 12-дневной инкубации. Спинномозговой узел. Импрегнация серебром. Дифференциация больших ганглиозных клеток.

Рис. 254. — *a* и *b* — куриный зародыш 12-дневной инкубации. Появление клеток однополюсного ганглиозного типа.

Рис. 255. — *a*, *b* и *c* — куриный зародыш 12-дневной инкубации. Дифференциация больших ганглиозных клеток. Импрегнация серебром.

Рис. 256. — *a* и *b* — куриный зародыш 12-дневной инкубации. Импрегнация серебром. На уровне мускулатуры двигательные нервные окончания.

Рис. 257. — Поперечный срез, произведенный через «экзенцефальный» мозг куриного зародыша.

Рис. 258. — Зародыш с спонтанной экзэнцефалией и контрольный зародыш того же возраста (7 дней).

Рис. 259. — *a* — куриный зародыш 7-дневной инкубации, которому произвели сечение ромбовидного мозга на 2-й день инкубации. Вид in situ : рассеченный ромбовидный мозг, анормальное сложение среднего мозга. Отсутствие аллантоисного пузырька. *b* — тот же зародыш после извлечения из яйца.

Рис. 260. — *a* — нормальный куриный зародыш 7-дневной инкубации. Выпуклость среднего мозга. *b* — зародыш с рассеченной покрышкой ромбовидного мозга; «цереброидный» аспект мозговых пузырьков.

Рис. 261. — *a* — нормальный куриный зародыш 8-дневной инкубации. *b* — зародыш того же возраста с рассеченным ромбовидным мозгом. Анормальный аспект среднего мозга, желудочковое кровоизлияние на уровне конечного мозга.

Рис. 262. — *a* — детали головы зародыша, изображенного на рисунке 261. *b* — отверстие ромбовидного мозга.

Рис. 263. — Вскрытие ромбовидного мозга через 48 часов от начала инкубации. Вид головы зародыша 12-дневной инкубации: мозговая грыжа в области ромбовидного мозга, анормальная сближенность глазных трубок.

Рис. 264. — Зародыш с вскрытым ромбовидным мозгом и «цереброидным» аспектом мозговых пузырьков, рядом с нормальным контрольным зародышем, с легким вздутием среднего мозга на 7-й день инкубации.

Рис. 265. — *a* и *b* — разрушение путем электро-термокаутеризации переднего и среднего мозга зародыша 45-часовой инкубации. «Бульбарный зародыш», фиксированный на 9-й день инкубации.

Рис. 266. — Заштрихованный прямоугольник представляет собой область, подвергнутую микрохирургическому вмешательству.

Рис. 267. — Бульбарный зародыш, изображенный на рисунке 265, в сравнении с нормальным контрольным зародышем.

Рис. 268. — *a*, *b*, *c* и *d* — Бульбарный зародыш, фиксированный на 16-й день инкубации. Разрушение при помощи электро-термокаутеризации переднего и среднего мозга через 45 часов от начала инкубации. Celosomia.

Рис. 269. — *a* — зародыш 17-дневной инкубации. Электрокоагуляция после 50 часов инкубации с частичным полуразрушением переднего и среднего мозга (с правой стороны). *b* — четыре кистозных образования (мозговые рудименты) в «опустелой» области. Конфигурация «косого клюва».

Рис. 270. — Зародыш 17-дневной инкубации. Частичное разрушение конечного и промежуточного мозга через 50 часов от начала инкубации. Грыжа одного из мозговых рудиментов. Двустороннее отсутствие глазных яблок.

Рис. 271. — *a* и *b* — «косой клюв», полученный путем извлечения амниотической жидкости.

Рис. 272. — Зародыш 9-дневной инкубации. Отсутствие правого глазного яблока (электротермокоагуляция через 50 часов от начала инкубации). Отсутствие зрительного нерва и соответствующего зрительного тракта. Асимметрия желудочковых полостей. Атрофия левой половины промежуточного мозга.

Рис. 273. — Спонтанный анэнцефал 7-дневной инкубации в сравнении с контрольным зародышем того же возраста.

Рис. 274. — *a*, *b* и *c* — куриный зародыш 6-дневной инкубации со спонтанным пороком развития; экзэнцефалия с церебродным видом головного мозга.

Рис. 275. — Конечный мозг куриного зародыша 8-дневной инкубации. Введение китайской туши в перивезикулярное сосудистое сплетение.

Рис. 276. — Куриный зародыш 8-дневной инкубации. Сосуды инъецированы китайской тушью. Васкуляризация мозговых пузырьков.

Рис. 277. — Срез стенки среднего мозга. Перивезикулярное сосудистое сплетение с эритроцитами.

Рис. 278. — Покров куриного зародыша породы леггорн 8-дневной инкубации (дорзальная область). Образование кожных сосочков.

Рис. 279. — Покров куриного зародыша 9-дневной инкубации. Срез на уровне зачатка эмбрионального пуха. Эпителиальный компонент, сосудисто-соединительнотканный компонент.

Рис. 280. — Дорзальный покров куриного зародыша породы леггорн 12-дневной инкубации. Капиллярные сосуды инъецированы китайской тушью.

Рис. 281. — Верхняя конечность куриного зародыша 12-дневной инкубации. Капиллярные сосуды инъецированы китайской тушью.

Рис. 282. — Дорзальный покров куриного зародыша 13-дневной инкубации. Капиллярные сосуды инъецированы китайской тушью.

Рис. 283. — *a* — покров куриного зародыша 12-дневной инкубации. Капиллярные сосуды инъецированы китайской тушью. *b* — другой участок того же покрова.

Рис. 284. — *a* — покров куриного зародыша 12-дневной инкубации. Верхняя конечность. Все сосуды инъецированы китайской тушью. *b* — другие детали того же препарата.

Рис. 285. — *a*, *b* и *c* — куриный зародыш 12-дневной инкубации. Покров. Импрегнация серебром. Иннервация сосочка. Нервный стволик проникает рядом с кровеносным сосудом в соединительнотканно-сосудистую ось сосочка; *b* и *c* — нервное сплетение кожи и иннервация сосочков.

Рис. 286. — Покров зародыша породы плимут 9-дневной инкубации. Выраженное размножение меланобластов внутри сосочков пуха.

Рис. 287. — Схематическое изображение подсадки гетеростадийного, онтогенетически хорошо развитого покрова. Сосочки хозяина, менее развитые, не стимулируются подсадкой.

Рис. 288. — Зародыш породы леггорн 6-дневной инкубации. Трансплант покрова породы плимут, с 5-дневным онтогенетическим опережением.

Рис. 289. — Зародыш породы леггорн 7-дневной инкубации, с трансплантом покрова породы плимут.

Рис. 290. — Зародыш породы леггорн 8-дневной инкубации .Трансплант покрова породы плимут с 5-дневным онтогенетическим опережением. Распространение меланобластов в теле хозяина.

Рис. 291. — Гибридный покров зародыша из рисунка 290.

Рис. 292. — Зародыш породы леггорн 11-дневной инкубации с трансплантом покрова породы плимут. Область распространения меланобластов в теле хозяина.

Рис. 293. — Зародыш породы плимут 8-дневной инкубации. Трансплант покрова породы леггорн с 5-дневным онтогенетическим опережением; трансплант почернел вследствие резкого размножения меланобластов хозяина.

Рис. 294. — *a* и *b* — поперечные срезы через сосочек покрова породы леггорн. Промеланобласты выявлены при помощи импрегнации серебром. Они расположены типичным образом у основания эпителиальных гребешков. *c* — поперечный срез через сосочек покрова породы плимут. Нормальное расположение меланобластов.

Рис. 295. — Схематическое изображение культуры «в яйце» эмбрионального покрова. *a* — удаление эмбриональной пластинки. *b* — наложение эмбрионального покрова на место эмбриональной пластинки. *c* — ретрансплантация культивированного в яйце покрова на куриный зародыш.

Рис. 296. — *a* — трансплант покрова голубя (пигментированной породы) на хозяина породы леггорн. Трансплант развивается непигментированным; «взрыв пигмента» в покрове хозяина; меланизация распространившихся промеланобластов. *b* — детали из *a*.

Рис. 297. — Схематическое изображение транспланта, в который проникают меланобласты. Акцептор: покров породы леггорн; донор: покров породы плимут.

Рис. 298. — Схематическое изображение транспланта, диффузирующего меланобласты. Акцептор: покров породы леггорн; диффузор: покров породы плимут.

Рис. 299. — Схематическое изображение транспланта, диффузирующего промеланобласты. Диффузор: покров голубя; акцептор: покров породы леггорн.

Рис. 300. — Схематическое изображение транспланта, невоспринимающего меланобласты. Диффузор: покров породы плимут; неакцептор: покров голубя.

Рис. 301. — Трансплантация покрова породы плимут на голубя. Отсутствие распространения меланобластов у хозяина.

Рис. 302. — *a* и *b* — детали из рисунка 301.

Рис. 303. — Трансплант покрова попугая (*Melopsitacus ondulatus*) на хозяина породы леггорн.

Рис. 304. — Вид меланобластов попугая, иммигрировавших в пух зародыша породы леггорн.

Рис. 305. — Вид меланобластов породы плимут, иммигрировавших в пух зародыша породы леггорн.

Рис. 306. — Схематическое изображение культуры эмбрионального покрова на хориоаллантоисной оболочке, не имеющей иннервации, но сохранившей кровоснабжение от зародыша.

Рис. 307. — Схематическое изображение смежной культуры: леггорн-плимут на хориоаллантоисе зародыша породы леггорн. Распространение меланобластов из покрова породы плимут в покров породы леггорн.

Рис. 308. — Схематическое изображение смежной культуры: леггорн-голубь на хориоаллантоисе зародыша породы леггорн. В этих условиях отсутствует меланизация промеланобластов голубя.

Рис. 309. — Смежная культура: леггорн-голубь на хориоаллантоисной оболочке зародыша породы леггорн. Распространение меланобластов.

Рис. 310. — Смежная культура: леггорн-голубь на хориоаллантоисной оболочке зародыша породы леггорн. В этих условиях отсутствует меланизация промеланобластов голубя.

Рис. 311. — *a* и *b* — тканевая культура (гепаринированная плазма) эмбрионального покрова пород леггорн-плимут. Образование смешанного мостика. Отсутствие развития меланобластов голубя.

Рис. 312. — *a* и *b* — тканевая культура покрова куриного зародыша породы плимут. Иммиграция и размножение меланобластов в области роста.

Рис. 313. — Куриные зародыши породы леггорн (*a* и *c*), которым произвели на 3-й день инкубации подсадку эмбрионального покрова голубя (пигментированной породы) 6-дневной инкубации. В (*b*) зародыш голубя (пигментированной породы) на 15-й день инкубации; его брат был использован как донор покрова для этих трансплантов. В покрове хозяина виден вокруг транспланта участок, резко пигментированный вследствие выхода промеланобластов из сосочков транспланта, остающихся непигментированными или очень слабо пигментированными. На покрове зародыша контрольного голубя рост и дифференциация сосочков перьев и отсутствие пигмента в течение эмбрионального развития (макроскопически пигмент появляется лишь через несколько недель после вылупливания).

Рис. 314. — Зародыш 6-дневной инкубации. *a* — мезонефрос. Трипановый синий. Исследование в свежем состоянии бинокулярной лупой. Темные поля представляют концентрации красителя. *b* — канальцы мезонефроса из *a*.

Рис. 315. — Объяснение то же, что на рисунке 314. *a* — об. 3, ок. 6. *b* — об. 7, ок. 6.

Рис. 316. — *a* — зародыш 7-дневной инкубации; трипановый синий. Мезонефрос наполнен красителем. Вид под лупой. *b* — разрез через зародыш 8-дневной инкубации; положительная реакция на щелочную фосфатазу в области канальцев мезонефроса.

Рис. 317. — Срез извитого канальца мезонефроса, содержащего зерна трипанового синего. Об. иммерсия, ок. 6.

Рис. 318. — Срез канальца мезонефроса зародыша 12-дневной инкубации; зерна трипанового синего лишь в извитых канальцах. Об. иммерсия, ок. 5.

Рис. 319. — Картина перерождения некоторых извитых канальцев мезонефроса зародыша 15-дневной инкубации. Об. иммерсия, ок. 5.

Рис. 320. — Двойная окраска нефронов трипановым синим. Темнее — голубая; светлее — фиолетовая.

Рис. 321. — Метанефрос. Зародыш 17-дневной инкубации; трипановый синий. Исследование свежего материала бинокулярной лупой. *a* — фотограмма. *b* — зарисовка.

Рис. 322. — Зародыш 7-дневной инкубации. Сферокристаллы мочевой кислоты в просвете собирательной трубки. Окраска нейтральным красным. *a* — об. 3, ок. 5. *b* — об. иммерсия, ок. 5.

Рис. 323. — Массивные скопления сферокристаллов мочевой кислоты в мезонефросе зародыша 16-дневной инкубации. Об. лупа, ок. 5.

Рис. 324. — Часть предыдущего препарата при объективе 7.

Рис. 325. — *a* и *b* — сферокристаллы, окрашенные нейтральным красным.

Рис. 326. — Расположение кристаллов мочевой кислоты в метанефросе.

Рис. 327. — Выделение индигокармина (мезонефрос).

Рис. 328. — Флуоресценция мезонефроса зародыша 6-дневной инкубации.

Рис. 329. — Флуоресценция мезонефроса зародыша 7-дневной инкубации.

Рис. 330. — Зародыш 13-дневной инкубации. Флуоресценция мезонефроса (справа); легкая флуоресценция метанефроса (слева).

Рис. 331. — Зародыш 14-дневной инкубации. Флуоресценция в мезо- и метанефросе.

Рис. 332. — Зародыш 15 дневной инкубации. Флуоресценция мезо- и метанефроса. Печень и железы флуоресцентны.

Рис. 333. — Реакция на щелочную фосфатазу в области мезонефроса зародыша 5-дневной инкубации.

Рис. 334. — Реакция на щелочную фосфатазу в области метанефроса зародыша 11-дневной инкубации. Об. лупа.

Рис. 335. — Сравнительная картина клубочков мезонефроса (*a*) и метанефроса (*b*) зародыша 17-дневной инкубации.

Рис. 336. — Слизистая желудка куриного зародыша 12-дневной инкубации. Явление мерокринной секреции.

Рис, 337. — Смешение мерокринной секреции с желудочным содержимым в мышечном желудке куриного зародыша 12-дневной инкубации.

Рис. 338. — Эпителий слизистой желудка зародыша 10-дневной инкубации. Появляются мелкие капли секреции в верхушке клеток.

Рис. 339. — Слизистая жёлудка куриного зародыша 12-дневной инкубации. В течение митоза ядра продвигаются к верхушке клеток.

Рис. 340. — *a* и *b* — явления секреции легочных эпителиев у куриного зародыша 7-дневной инкубации.

Рис. 341. — Куриный зародыш. Начало 6-го дня инкубации. Артериальный ствол («вентральная аорта») с III, IV и VI жаберными артериальными дугами. Пластическое восстановление. *BC*- *bulbus cordis*; *AO* — дорзальная аорта; *Tr a* — артериальный ствол; *Tr el pr b* — нижний конец первоначального эластического тракта; *Tr el pr a* — верхний конец первоначального эластического тракта.

Рис. 342. — Куриный зародыш. Начало 4-го дня инкубации. Срез на уровне артериального ствола (*T*); первоначальный эластический тракт (↓). VI — 6-я артериальная дуга. Срез соответствует уровню нижнего конца первоначального эластического тракта, изображенного на рисунке 341.

Рис. 343. — Куриный зародыш. Конец 4-го дня инкубации. Восстановление сердца, сосудистых жаберных дуг и аорты. Первоначальный эластический тракт (*tr el pr a* и *b*) отмечен более темным оттенком. *At* — предсердие; *S V* — *sinus venosus*; *V c i* — нижняя полая вена; *V* — желудочек; *El par* — пристеночная эластическая ткань; *PE* — эндокардическая подушечка; *B C* — *bulbus cordis.*

Рис. 344. — Пластическое восстановление. Объяснение то же, что на рисунке 343.

Рис. 345. — Поперечный срез куриного зародыша к концу 4-го дня инкубации. *A* — дорзальная аорта; *V C* — кардинальные вены; *at* — предсердие; *B* — *bulbus cordis*; *V* — желудочек — область первоначального эластического тракта в эмбриональном «средостении».

Рис. 346. — *a* — куриный зародыш 5-дневной инкубации. Поперечный разрез через аорто-легочную перегородку (*S*). *P* — легочная артерия; *A* — аорта. Зернистая масса темного цвета — первоначальный эластический тракт. *b* — детали.

Рис. 347. — «Эластические» зерна из первоначального эластического тракта.

Рис. 348. — Куриный зародыш 5-дневной инкубации. *a* — первоначальный эластический тракт. Расположение «эластических» зерен под видом «стрептококковых» цепочек; *b* — неокрашенное волоконце, в котором происходит дифференциация зерен.

Рис. 349. — Куриный зародыш 7-дневной инкубации. Поперечный разрез через *bulbus cordis*. *A* — аорта; *P* — легочная артерия; (↓) — зернисто-волокнистый эластический тракт перегородки. Развитие пристеночных эластических волокон.

Рис. 350. — Разрез через *bulbus cordis*, изображенный на рисунке 349. Более дистально. (↓) — эластический тракт; *A* — аорта. *P* — легочная артерия.

Рис. 351. — Куриный зародыш 11-дневной инкубации. Эластический рудимент (*rest* IV) 4-й сосудистой дуги с левой стороны (превратившийся в эластическую связку). *A* — аорта.

Рис. 352. — *a* и *b* — куриный зародыш 6-дневной инкубации. Восстановление сердца и крупных сосудов. *A S* — левое предсердие. *V S* — левый желудочек. *A D* — правое предсердие. *V D* — правый желудочек. *P D* — правая легочная артерия. *P S* — левая легочная артерия. *A O* — аорта. *E par* — пристеночная эластическая ткань; *Rest tr el pr* — остаток первоначального эластического тракта; *El sept* — септальная эластическая ткань.

Рис. 353. — Деталь рисунка 352. Объяснение то же, что на рисунке 352.

Рис. 354. — Схематическое изображение артериального ствола частично перегороженного. Расположение пристеночных эластических элементов (*par*) по отношению к эластическому тракту перегородки (↓).

Рис. 355. — Эластические волокна (взрослый человек). Выявление структурной прерывистости.

Рис. 356. — Человеческий зародыш с его придатками, 2-й месяц; (↓) — желточный мешок.

Рис. 357. — Куриный зародыш 7-дневной инкубации. Желточный мешок. Образование «желточной складки». Оба ската, образованные желточной энтодермой, слепились. В складках находится желточная артерия со смежными кроветворными капиллярами, наполненными молодыми элементами крови. Вакуоли желточной энтодермы пусты (во время препаровки для заливки в парафин жиры были растворены).

Рис. 358. — Детали рисунка 357. Внутри артерии циркулирующие эритроциты. Околоартериальные кроветворные очаги полны молодыми элементами крови.

Рис. 359. — Желудочный мешок; 13-й день инкубации. Тотальное инъецирование китайской туши; поверхностная сеть и собирательные вены; резкое появление из глубины соединительных стволов.

Рис. 360. — Поверхность желточного мешка 13-дневной инкубации. Инъецирование китайской туши. Желточные вены; сеть поверхностных капилляров и соединительные сосуды, появляющиеся из глубины (из желточных складок, погруженных в массу желтка); видны линии погружения.

Рис. 361. — Стенка желточного мешка 12-дневной инкубации. Тотальное инъецирование китайской туши. Реакция на бензидин, общий препарат, просветление глицерином. Рисунок при помощи камеры-клары. *A* — желточная артерия со смежными кроветворными очагами. Их отношения с соединительными капиллярными сосудами, которые впадают в поверхностные вены. *V*—собирательные вены желточного мешка.

Рис. 362. — Срез желточной складки через 13 дней после начала инкубации. Окраска гематоксилин-эозином; об. 7, ок. 15. Зарисовка при помощи камеры-клары. *a* — просвет артерии. Вокруг нее скопление эозинофилов (миэлоцитоподобных). Три расширенных кроветворных капилляра.

Рис. 363. — Желточная складка. Продольный разрез через одну из желточных артерий (содержит дифференцированные эритроциты). (↓) — околоартериальное расположение кроветворных очагов, образующих «четкообразные отростки».

Рис. 364. — Желточная складка на 17-й день инкубации. Обзорный препарат. Реакция на бензидин. Четкообразный отросток, «шипы». Приартериально.

Рис. 365. — Желточный мешок на 15-й день инкубации. *V* — желточные вены. *A* — желточная артерия в кроветворной складке.

Рис. 366. — Желточная складка на 15-й день инкубации. Желточная артерия с кроветворными узлами в центре сети капилляров.

Рис. 367. — Желточный мешок, зародыш 13-дневной инкубации; инъецирование китайской туши. Срез перпендикулярный к поверхности мешка (картина под лупой). Видны: поверхностная сосудистая сеть, желточные складки (*A A*) с «погруженными» желточными артериями, окруженными кроветворными очагами, и желточная энтодерма.

Рис. 368. — *a* и *b* — желточный мешок. Общий вид. Расположение кроветворных желточных складок.

Рис. 369. — Сосудистое поле, развившееся после перерыва связи с сердцем на 2-й день инкубации. Картина на 6-й день инкубации. Реакция на бензидин.

Рис. 370. — Сосудистое поле без кровообращения на 5-й день инкубации. Видны тупики сосудов.

Рис. 371. — Сосудистое поле без кровообращения на 6-й день инкубации (зародыш был уничтожен на 2-й день инкубации). Концентричные переплетенные участки синусоидальных сосудов. Центральная кровяная киста.

Рис. 372. — Сосудистое поле без кровообращения на 6-й день инкубации. Общая конфигурация.

Рис. 373. — Образование сосудистого поля через 2 дня после эксцизии зародыша, произведенной в течение первого дня инкубации.

Рис. 374. — Сосудистое поле без кровообращения, желток, желточная энтодерма с внутриклеточными желточными зернами и сосуд, содержащий дифференцированные эритроциты, на 7-й день после инкубации. Желточные складки «погружения» не образовались.

Рис. 375. — Деталь из рисунка 374. Сосуды с дифференцированными эритроцитами, клетки желточной энтодермы с внутриклеточными желточными зернами.

Рис. 376. — Срезы бластодермы зародыша 24-часовой инкубации. Фазово-контрастное изображение. *a* — эктодерма; *M* — мезодерма с кровяными островками (Вольфа-Пандера). *E V* — желточная энтодерма с желточными зернами и «сингранулами» (по терминологии О. Б. Лепешинской). *b* — кровяной островок в толще мезодермы (*M*). *E V* — желточная энтодерма в стадии синцития, содержащая желточные зерна. Вблизи кровяного островка (↓) «сингранул».

Рис. 377. — Срез сосудистого поля куриного зародыша 24-часовой инкубации. *a* — *M* — мезодерма с кровяными островками (Вольфа-Пандера). *E V* — желточная энтодерма. (↓) — граница темного поля, зародышевый вал. Кровяной островок в толще энтодермы. *b* — 2 кровяных островка в толще синцитиальной желточной энтодермы вблизи синgranула, готовые проникнуть в мезодерму. Вверху мезодерма с кроветворной тканью. *c* — деталь.

Рис. 378. — Срезы эмбриональной пластинки куриного зародыша 24-часовой инкубации. *a* — посередине видно эмбриональное поле с первоначальной бороздой, экто-, мезо- и энтодерма. Сбоку видно прозрачное поле. (↓) — граница темного поля; *b* — левая половина препарата из *a*. (↓) — желточный сингранул проник в кровяной островок.

Рис. 379. — *a* — деталь из рисунка 378. *b* — картина при большем увеличении. *M* — мезодерма с кровяными островками типа Вольфа-Пандера. *E V* — желточная энтодерма в синцитиальной стадии. Образование «сингранулов». *S* — синgranул внутри кровяного островка. *c* — другая картина из той же серии; сингранул, расположенный между мезо- и энтодермой.

Рис. 380. — Зародыш 30-часовой инкубации. Прижизненная окраска нильским синим. Резко окрашенные желточные элементы.

Рис. 381. — Деталь из рисунка 380. Видны желточные элементы в состоянии фрагментации (сингранулы).

Рис. 382. — *a* и *b* — сосудистые поля без кровообращения у зародыша 4-дневной инкубации. Тело зародыша было сохранено.

Рис. 383. — *a* и *b* — зародыши из рисунка 382. Поперечное удлинение сомитов, продолжение их дифференциации в каудальном направлении и фрагментация некоторых сомитов (↓); развитие амниона.

Рис. 384. — Схематическое изображение приготовления яйца для облучения.

Рис. 385. — Куриный зародыш 2-дневной инкубации, подвергнутый облучению через 36 часов от начала инкубации. Реакция на бензидин (через 12 часов после облучения). Облученная половина сосудистого поля развивается с запозданием. *a* — нормальный контрольный зародыш. *b* — облученный зародыш.

Рис. 386. — Облучение наружного участка левой половины сосудистого поля через 48 часов от начала инкубации. Вид сосудистого поля через 72 часа от начала инкубации. Облученный участок в состоянии линейно ограниченного некроза. Началась перестройка сосудистой сети.

Рис. 387. — Облучение правой половины сосудистого поля через 48 часов от начала инкубации. Вид сосудистого поля через 48 часов после облучения. Почти полное исчезновение облученной половины сосудистого поля. Эксцентричное положение зародыша; с правой стороны новообразованный краевой синус.

Рис. 388. — Срез необлученной части сосудистого поля через 72 часа от начала инкубации. Нормальные желточные сосуды, содержащие эритроциты.

Рис. 389. — Срез участка сосудистого поля, смежного с облученным участком. Тот же зародыш, что на рисунке 388. Компактные кровяные островки (типа Вольфа-Пандера). Отсутствие кровяных сосудов.

Рис. 390. — Деталь из рисунка 389 при большем увеличении. *a* — отсутствие митозов в клетках островка. Желточная энтодерма с желточными зернами. Фазовый контраст. В *b* видны ядра желточной энтодермы.

Рис. 391. — Деталь из рисунка 389 при большем увеличении. Клетки кровяного островка, ядра желточной энтодермы. Вид желточных шаров из клеток энтодермы. Иммерсия. Контрастная фаза.

Рис. 392. — Хориоаллантоис зародыша 9-дневной инкубации. Инъецирование всех сосудов китайской тушью. *a* — общий вид аллантоиса, растянутого на желточной сети. *b* — деталь при большем увеличении. Пятно является экстравазатом, образовавшимся на месте инъекции.

Рис. 393. — *a* и *b* — инъекция китайской туши, произведенная зародышу 9-дневной инкубации. Типичное разветвление артерий и вен.

Рис. 394. — *a* и *b* — инъекция китайской туши. Аллантоис зародыша 9-дневной инкубации. Артерии более темные, вены более светлые. Выявление дыхательных капилляров.

Рис. 395. — Зародыш 9-дневной инкубации. Инъекция китайской туши. «Долька» с афферентными сосудами. Дыхательные капилляры.

Рис. 396. — *a* и *b* — хориоаллантоис зародыша 9-дневной инкубации. Инъекция китайской туши. Дыхательные капилляры. Обзорный препарат. Просветление глицерином.

Рис. 397. — *a* и *b* — хориоаллантоис зародыша 12-дневной инкубации. Соотношение между эпителием и дыхательными капиллярами.

Рис. 398. — *a* и *b* — инъецирование китайской тушью хориоаллантоиса зародыша 14-дневной инкубации. Полное развитие оптимальной функциональной структуры сосудистой сети.

Рис. 399. — Изменения яичного белка и яичного желтка вместе с подзародышевой жидкостью.

Рис. 400. — Образование подзародышевой жидкости.

Рис. 401. — Изменения яичного белка и яичного желтка. Метод кипячения.

Рис. 402. — Изменения pH.

Рис. 403. — Изменения жиров в подзародышевой жидкости (алкогольно-эфирный экстракт).

Рис. 404. — Глюкоза в подзародышевой жидкости.

Рис. 405. — Белковые вещества в подзародышевой жидкости.

Рис. 406. — *a* и *b* — техника внутриаллантоисного введения жидкого желтка. Яйцо 5-дневной инкубации, широко раскрытое для демострации. Виден инъецированный аллантоисный мешок. Он покрывает частично тело зародыша, к которому сходятся желточные сосуды. Желточный мешок был вскрыт в (↓). Через это отверстие можно извлечь в момент вскрытия приблизительно 15 мл жидкого желтка.

Рис. 407. — *a*, *b*, *c* и *d* — полученные при подсушке жидкого желтка кристаллы, среди которых находятся желточные зерна.

Рис. 408. — Цыплята породы леггорн при вылупливании. На 5-й день инкубации им были введены 2 мл желточной жидкости в аллантоисный мешок. Вес в момент вылупливания равняется 43 г. Рядом с цыпленком известковая скорлупа яйца с отверстием, сделанным для инъекции.

Рис. 409. — Цыпленок из рисунка 408 рядом с контрольным цыпленком через неделю после вылупливания.

Рис. 410. — Другое положение цыпленка из рисунка 408 вместе с контролем.

Рис. 411. — Нормальное соотношение между весом яйца до инкубации, весом яйца к концу инкубации и весом свежевылупившегося цыпленка; в среднем вес цыпленка на 20 г меньше, чем вес яйца до инкубации.

Рис. 412. — Кривые нормального роста (контроль) весенних цыплят. В 7-месячном возрасте вес петухов доходит до 2 000—2 500 г, а вес кур — до 1 500 г.

Рис. 413. — Кривые роста нормальных кур при летнем высиживании. Вес 7-месячных кур колеблется от 1 120 до 1 450 г.

Рис. 414. — Кривые роста одной пары из экспериментального родительского поколения.

Рис. 415. — *a*, *b*, *c* и *d* — вес яйца и соответствующих цыплят F_1, происходящих от кур родительского поколения. Спонтанный сверхвес, в особенности резкий у курицы № 54.

Рис. 416. — Кривые роста весенней группы F_1 (кривые, отмеченные пунктиром, являются контрольными); в возрасте 6 месяцев вес петуха достиг 3 кг.

Рис. 417. — Кривые роста летней группы поколения F_1 (заштрихованы вертикально) по сравнению с контрольной группой (заштрихованы горизонтально). Максимумы контрольной группы совпадают частично (от 3 до 6-го месяца) с диапазоном изменчивости экспериментальной группы. Экспериментальная группа состоит из 18 кур, а контрольная — из 7 кур. Узкий диапазон изменчивости экспериментальной группы.

Рис. 418. — Вес яйца до инкубации и вес соответствующих свежевылупившихся цыплят поколения F_2 (1953). За исключением 4, у всех остальных цыплят спонтанный сверхвес в момент вылупливания.

Рис. 419. — Цыплята поколения F_2 по сравнению с контрольными цыплятами.

Рис. 420. — Петухи *A*, *B*, *C* (вылупившиеся в один и тот же день) в возрасте 2 месяцев. *A* — потомок F_1 инъецированного родительского поколения. *B* — контроль. *C* — петух, вылупившийся из неинъецированного тяжелого яйца.

Рис. 421. — Цыплята, изображенные на рисунке 420, в возрасте 7 месяцев.

Рис. 422. — Другое изображение цыплят. Цыплята в возрасте 7 месяцев.

Рис. 423. — Поколение F_2 рядом с нормальным контролем.

Рис. 424, 425, 426 и 427. — Другие цыплята из той же группы, что на рисунке 423.

Рис. 428. — Синоптическая таблица средних величин веса яиц, веса цыплят в первый день после вылупливания и веса 7-месячных кур экспериментальных поколений *P*, F_1, F_2. Прогрессивный характер среднего веса.

Рис. 429. — *a* и *b* — контрольный эксперимент (1953). Одинакового веса яйца экспериментальной группы F_1 и от контрольной группы. Видна четкая разница между весом свежевылупившихся цыплят, принадлежащих к этим двум группам. У цыплят экспериментальной группы отмечается спонтанный сверхвес, а у контрольных — вес нормальный или ниже нормального.

RECHERCHES D'EMBRYOLOGIE EXPÉRIMENTALE

I^er VOLUME

RÉSUMÉ

INTRODUCTION

L'auteur expose dans l'introduction sa conception concernant la source des forces motrices des processus de développement individuel.

Les processus de développement des êtres vivants constituent toujours des complexes d'interactions. Ils ne peuvent être recherchés et expliqués que par la découverte et l'analyse — suivie de la synthèse — de tous les éléments, conditions et facteurs, en transformation incessante, qui participent à la constitution du complexe d'interactions qui se trouve à la base du processus de développement et qui mérite le nom de «complexe ontogénétique». On y analyse la phase embryonnaire de ce complexe ontogénétique (le «complexe embryonnaire»).

Quelqu'anciennes que soient au point de vue phylogénétique les formations ou les fonctions reproduites par l'hérédité, elles se réalisent au cours d'un développement individuel seulement grâce à l'enchaînement de processus actuels, présents dans le complexe embryonnaire.

Mais chacun de ces processus représente le terme le plus récent d'un long processus historique.

Les parties constituantes du corps de l'embryon de tous les degrés, ses annexes et les substances embryotrophiques, l'organisme maternel et son ambiance (ou l'ambiance de l'œuf, respectivement de la larve) sont les éléments constitutifs du complexe ontogénétique embryonnaire.

Analyser les éléments constitutifs de ce complexe et leurs fonctions, c'est dévoiler les forces motrices du processus de développement ontogénétique.

La conviction que la totalité de ces forces peuvent être exprimées par — et ont leur sources dans — ce «complexe ontogénétique» embryonnaire, déterminé historiquement, en ayant leur origine dans les interactions qui se passent au sein de ce dernier, constitue — selon l'opinion de l'auteur — l'une des bases de la conception matérialiste-dialectique de l'ontogénèse.

Le chapitre introductif est illustré par une série de schémas représentant la conception du complexe ontogénétique embryonnaire.

Les recherches exposées dans ce travail ont été pour la plupart effectuées par l'auteur en collaboration avec le collectif d'Embryologie expérimentale de la Base de Recherches Scientifiques de l'Académie de la R.P.Roumaine, de Timișoara.

PREMIÈRE PARTIE

INTRODUCTION À LA TECHNIQUE DE L'OBSERVATION VITALE ET DES INTERVENTIONS DIRECTES SUR L'EMBRYON D'OISEAU

Ce chapitre s'adresse en premier lieu aux débutants désireux de s'initier en embryologie expérimentale. On y expose, comme il ressort aussi de la table des matières, quelques techniques originales de l'auteur, telles que :

a) La technique du myéloschisis expérimental

b) La transplantation sur le corps de l'embryon à l'aide de la technique du myéloschisis

c) La désamniotisation

d) La désallantoïdisation

e) La culture «dans l'œuf», etc.

A la fin de ce chapitre, on trouve trois annexes :

1. La systématisation des méthodes et des techniques de l'embryologie expérimentale sur la base du principe des «étages structuraux».

Les méthodes et les techniques y sont systématisées d'après le niveau structural dans lequel on intervient initialement, par la technique respective. Par exemple : des méthodes qui s'adressent à l'étage de «l'ultra-structure» (sous-microscopique), à l'étage des «structures microscopiques, macroscopiques», ou des techniques qui interviennent dans la structure du milieu externe, dans l'organisme parental, dans l'ambiance proche de l'embryon, etc.

2. La IIe annexe s'occupe des méthodes histochimiques plus fréquemment appliquées dans l'embryologie expérimentale.

3. La IIIe annexe représente, en vue d'une orientation plus facile, l'anatomie normale de l'embryon de poulet, aux différentes étapes de l'ontogénèse.

DEUXIÈME PARTIE

RECHERCHES SUR LE DÉVELOPPEMENT DE LA RÉACTIVITÉ DE L'EMBRYON ET DE SES ANNEXES

Entre les parties constitutives du «complexe embryonnaire» se développent des interactions, source des forces motrices du processus de développement individuel. Ceci signifie que chaque partie de l'organisme de l'embryon répond (d'une manière différente pour chaque partie) aux influences exercées par les autres parties du complexe embryonnaire, devenant à son tour un nouvel excitant dans le processus de développement de ces parties.

Le résultat de ces interactions compliquées peut donc être considéré comme un effet de la réactivité des parties constitutives du complexe embryonnaire : «réactivité d'interaction».

Les formes de ces réactivités se modifient quantitativement et qualitativement, pour chaque partie de l'organisme embryonnaire à travers les différents stades du développement individuel.

Nous sommes en droit de chercher dans l'ontogénèse embryonnaire une succession et une complication des modes de réactivité, à partir des formes élémentaires similaires à celles présentes chez les protozoaires (mouvements cellulaires, phagocytose, digestion intracellulaire, etc.), en allant jusqu'aux formes humorales et neuro-humorales.

Ce que nous venons de démontrer fait ressortir la liaison entre l'interaction des parties constituantes du complexe embryonnaire, leur réactivité et le processus ontogénétique même. A ce point de vue, nous pouvons considérer tout le processus ontogénétique embryonnaire — sous son aspect fonctionnel et morphologique — comme l'expression de la réactivité des parties constituantes vivantes de l'embryon et de ses organes-annexes extra-embryonnaires qui se développent comme un système complexe d'interrelations en transformation incessante.

Fondée sur la conception de I. I. Metchnikoff, qui a mis la réactivité à la base de l'apparition des premiers degrés phylogénétiques — notamment du passage des protozoaires aux métazoaires — la recherche de la réactivité des composants du complexe embryonnaire devient un moyen d'analyse du processus ontogénétique.

RECHERCHES SUR LA PHAGOCYTOSE CHEZ L'EMBRYON DE POULET

On décrit une série de recherches expérimentales sur la capacité de phagocytose des cellules embryonnaires dans les différentes parties de l'embryon et à différentes époques du processus de développement.

L'injection d'encre de Chine, diluée dans l'espace sous-embryonnaire, au bout de deux jours d'incubation, est suivie de l'intense phagocytose de l'encre de Chine par les cellules de l'endoderme vitellin (surtout au niveau du rempart vitellin). L'endoderme vitellin peut être considéré comme un «phagocytoblaste» déployé.

On décrit les résultats des injections interstitielles d'encre de Chine (dans les tissus et les organes de l'embryon), dans le cœlome, l'amnios, l'allantoïde, et surtout dans l'appareil circulatoire, dans le canal épendymaire du tube neural.

L'épithélium amniotique s'avère être phagocytant, à l'encontre de l'épithélium tégumentaire du corps de l'embryon, qui ne possède pas cette propriété.

La réactivité de la membrane chorio-allantoïdienne est particulièrement grande.

Les éléments mésenchymateux phagocytants sont des cellules du type macrophagique, chargées de gouttes lipidiques. Ils fixent le trypan bleu.

Une place particulière est occupée, dans ce chapitre, par la recherche de la phagocytose des granules mélaniques (des mélanoblastes propres) par les macrophages de l'embryon. On étudie ce phénomène *in situ* et dans la culture de tissu (au niveau du tégument embryonnaire des races pigmentées d'oiseaux).

On a étudié la phagocytose de l'encre de Chine dans la culture de tissu aussi et on a constaté l'intense capacité phagocytante des cellules mésenchymateuses.

La phagocytose apparaît donc, dès le début de l'ontogénèse, chez l'embryon de poulet, comme une forme de réactivité des cellules embryonnaires, forme étroitement liée aux fonctions de nutrition et à d'importants processus morphogénétiques progressifs. La phagocytose joue également un rôle important dans le processus de réduction et de limitation du matériel cellulaire propre (processus ontogénétiques régressifs).

Dès les premiers jours de son existence, l'embryon a la possibilité de réagir aussi contre des corps étrangers introduits artificiellement ou accidentellement. La réactivité, liée à la fonction de nutrition et à la fonction de défense, se superpose au début de l'ontogénèse.

A côté des macrophages et des éléments mésenchymateux, l'endothélium vasculaire et certains épithéliums sont également phagocytants. Le tube neural ne phagocyte pas, à l'exception de l'épithélium du plafond du rhombencéphale.

Les formations embryonnaires cependant ne présentent pas toutes, simultanément, le même degré de réactivité. Ainsi, les membranes extra-embryonnaires s'avèrent être douées d'une réactivité plus intense que les éléments qui entrent dans la composition du corps de l'embryon.

Ce phénomène constitue l'objet des recherches exposées dans les chapitres suivants.

RECHERCHES COMPARÉES SUR LES RÉACTIONS HYPERPLASTIQUES DE L'ÉPITHÉLIUM CHORIO-ALLANTOÏDIEN ET DE L'ÉPITHÉLIUM TÉGUMENTAIRE DU CORPS DE L'EMBRYON DE POULET

L'épithélium de la membrane chorio-allantoïdienne et l'épithélium tégumentaire du corps de l'embryon sont soumis à l'action d'une gamme d'«excitants» (corps anorganiques, organes embryonnaires ou adultes homéo- ou hétérospécifiques, tumeurs malignes).

On constate que l'épithélium chorio-allantoïdien réagit intensément — surtout dans le cas de tissus tumoraux malins — en donnant lieu à des hyperplasies, des perles épithéliales et des travées épithéliales qui se dirigent vers la greffe «excitante».

A l'encontre de cette réactivité vigoureuse de l'épithélium chorio-allantoïdien, l'épithélium tégumentaire du corps, soumis à l'action des mêmes excitants et examiné au même âge, simultanément avec l'apparition des réactions au niveau de la membrane chorio-allantoïdienne, ne présente que très peu de modifications.

On interprète ces faits dans le sens d'une réactivité acquise par les membranes extra-embryonnaires chez les sauropsides ovipares, au cours de la phylogénèse. En effet, des microorganismes pénètrent constamment par les pores de la coquille de l'œuf jusqu'à la première couche vivante à l'intérieur de l'œuf, qui acquiert une réactivité particulière.

Le corps de l'embryon, situé en profondeur, ne possède pas pour le moment cette réactivité.

On discute l'hypothèse de travail de la relation entre le phénomène décrit et l'apparition phylogénétique du placenta chez les vivipares.

LA RÉACTIVITÉ DU CORPS DE L'EMBRYON ET DE LA MEMBRANE CHORIO-ALLANTOÏDIENNE À L'INFECTION AU BACILLE DE KOCH

Tout comme dans les recherches exposées dans le chapitre précédent, la réactivité à l'infection au bacille de Koch est nettement différente — comme manifestation morphologique — dans la membrane chorio-allantoïdienne et dans le corps de l'embryon.

Tandis que sur la membrane se développent : un abondant tissu inflammatoire, des tubercules, des symplastes et des hyperplasies épithéliales, le corps de l'embryon impressionne par l'absence ou le peu de réactivité, même en présence des bacilles virulents.

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES SUR LE DÉVELOPPEMENT ET LA RÉACTIVITÉ DU SYSTÈME NERVEUX CHEZ L'EMBRYON DE POULET

L'ontogénèse embryonnaire ne peut être étudiée avec succès si l'on considère les parties de l'embryon isolées les unes des autres. Les différentes régions et parties constitutives du corps embryonnaire, appartenant aux domaines macro-, micro- et sous-microscopiques, les substances nutritives, les annexes de l'embryon, les organismes parentaux et leur ambiance, tous ces composants fondamentaux dans le processus du développement embryonnaire, qui constituent le complexe ontogénétique embryonnaire, doivent être considérés en étroite relation et interaction au cours des différentes étapes de l'ontogénèse.

La conviction que la totalité des forces motrices actuelles du processus ontogénétique ont leur source dans ce complexe ontogénétique déterminé historiquement, qu'elles ont leur origine dans les interactions ayant lieu au sein de ce dernier, constitue une des bases de la conception matérialiste-dialectique de l'ontogénèse.

Il faut admettre l'existence d'interrelations spécifiques de chaque stade de l'ontogénèse, même aux phases les plus précoces de cette dernière, interrelations qui se confondent à vrai dire avec les fonctions des parties constituantes de l'organisme embryonnaire dans ces périodes.

Le rôle que les différents composants de l'organisme embryonnaire et de tout le complexe embryonnaire jouent dans ce système d'interactions change d'une étape de développement à l'autre. A mesure que se différencient les tissus et les organes, leurs interrelations se différencient aussi.

La réalisation du processus ontogénétique, le passage par chaque stade nécessitent, pour chaque partie du corps embryonnaire, la présence d'un certain complexe de conditions, établies au cours de la phylogénèse.

Il est clair que, en prenant cette conception comme point de départ, des périodes «préfonctionnelles» ne sont pas admissibles.

Jusqu'à ce que la ressemblance fonctionnelle et morphologique avec l'organisme complètement développé soit atteinte, donc jusqu'au «seuil physiologique adulte», les organes embryonnaires peuvent être liés par des interrelations (par conséquent ils peuvent avoir des fonctions), qui diffèrent quantitativement et qualitativement des fonctions définitives («adultes»).

Il y a pourtant une évolution continue des interrelations existantes entre les éléments constitutifs de l'embryon, qui se manifestent visiblement par le progrès même de la différenciation morpho-fonctionnelle.

La connaissance de toutes ces interactions «actuelles» et de leurs conséquences, ainsi que de leur histoire phylogénétique, serait équivalente à la compréhension du processus de développement individuel entier.

Les recherches qu'on expose dans ce chapitre ont pour but d'établir la place qu'occupe le système nerveux embryonnaire dans le tissu d'interactions qui se trouve à la base du développement embryonnaire, le rôle qu'il joue à travers le développement des stades ontogénétiques successifs dans ce système et les influences qu'il subit à son tour pendant cette période.

Il y a dans la littérature de nombreuses recherches dans ce domaine, avec des résultats très contradictoires. Tandis que certains auteurs vont jusqu'à nier l'influence du système nerveux embryonnaire sur le processus de différenciation des autres organes, d'autres auteurs, au contraire, attribuent à l'innervation embryonnaire un rôle important dans l'ontogénèse.

Il est probable que, avant la différenciation morpho-fonctionnelle de la transmission nerveuse des excitations à distance pendant l'ontogénèse, les ébauches nerveuses agissent et sont influencées uniquement par voie humorale, ou par la voie de l'excitabilité générale du protoplasma, de cellule en cellule.

Dans les recherches entreprises par l'auteur, il a employé la méthode des extirpations, des destructions locales, de la réouverture du tube neural au niveau de la moelle ou du rhombencéphale, en utilisant les techniques des interventions mécaniques, thermiques et à l'aide des agents radiants.

Un large emploi ont trouvé aussi les méthodes de la transplantation et de l'explantation d'organes embryonnaires dans des zones sans innervation, l'utilisation de la mélanogénèse comme indicateur de la différenciation neuro-humorale et l'utilisation des différences de la vitesse de différenciation du système neuro-endocrinien chez les espèces d'oiseaux nidifuges et nidicoles.

INTERVENTIONS SUR LA MOELLE ÉPINIÈRE. RÉOUVERTURE DU TUBE NEURAL MÉDULLAIRE. LE MYÉLOSCHISIS EXPÉRIMENTAL

L'auteur et ses collaborateurs ont déjà réalisé en 1948 la réouverture expérimentale du tube neural chez l'embryon de poulet, au bout de trois jours d'incubation (myéloschisis expérimental).

On étudie l'effet de cette intervention sur la moelle et sur les organes avoisinants.

On obtient une plaque neurale deployée sur la surface dorsale de l'embryon. De cette manière la surface épendymaire de la moelle reste longtemps exposée à la vue directe.

Sous la plaque neurale se forme une bande mésenchymateuse que certains auteurs considèrent, par erreur, comme un facteur déterminant dans la malformation spontanée (spina bifida).

L'auteur emploie la méthode du myéloschisis expérimental pour implanter des greffes dans le tube neural ouvert.

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES SUR LE DÉVELOPPEMENT DES FONCTIONS DE LA MOELLE EMBRYONNAIRE ET SES POSSIBILITÉS DE RÉGÉNÉRATION ET DE COMPENSATION APRÈS DES DESTRUCTIONS LOCALISÉES

A l'aide de la thermocoagulation, on effectue des destructions de la moelle embryonnaire au bout de trois jours d'incubation.

On détruit la moelle, partiellement ou complètement, sur la longueur de 5 à 10 segments, au niveau des membres supérieurs ou inférieurs.

Technique : on exécute au préalable la réouverture du tube neural (myéloschisis expérimental), ensuite on introduit le cautère dans le tube neural et on cautérise la moelle dans sa partie épendymaire.

La moelle embryonnaire peut se régénérer. Les premiers jours après l'opération il se forme de multiples canaux centraux, qui constituent le point de départ du processus de régénération. L'extrémité centrale de la moelle (au niveau du défaut opératoire) émet des troncs nerveux néoformés qui se dirigent :

a) vers la région ventrale, en traversant le sclérotome et ensuite la vertèbre formée entre temps ;

b) vers les somites ou vers la musculature de la paroi latérale du tronc ;

c) vers les ganglions rachidiens restants après la cautérisation et qui ont perdu le contact avec le segment correspondant de la moelle. Les prolongements néoformés apportent de cette manière un contingent de fibres motrices au reste du nerf rachidien, qui n'a conservé après l'intervention que les fibres afférentes des cellules nerveuses du ganglion rachidien ;

d) vers les ganglions sympathiques.

Les ganglions rachidiens restants dans la région du défaut médullaire peuvent perdre toute relation avec la moelle. Ils demeurent attachés à la périphérie par leurs axones afférents.

Cinq à dix jours après l'intervention, les membres correspondant à la région affectée sont toujours innervés, mais leurs troncs nerveux sont plus minces que les troncs nerveux normaux. Les membres conservent une conformation normale jusqu'au 12^e ou 13^e jour d'incubation. Leurs mouvements typiques de brusque extension et flexion persistent aussi. Examinés le 16^e jour d'incubation, les membres des embryons ayant des défauts médullaires commencent à présenter des positions vicieuses des doigts («griffe»), des doigts atrophiques et une immobilité totale, qui contraste avec les mouvements normaux des embryons témoins.

Il résulte de ces données expérimentales que l'innervation qui reste après l'opération correspond aux nécessités de différenciation à une première période de l'ontogénèse embryonnaire, mais devient insuffisante pour les exigences du processus de développement à la période suivante, à laquelle l'intégrité du segment médullaire correspondant est indispensable au développement et à la différenciation morpho-fonctionnelle normale des membres.

INTERVENTIONS SUR LES VÉSICULES CÉRÉBRALES. RECHERCHES SUR LES EFFETS DE LA RÉOUVERTURE DU RHOMBENCÉPHALE ET SUR LE RÔLE DU LIQUIDE ÉPENDYMAIRE DANS LE DÉVELOPPEMENT DU CERVEAU

On décrit le mécanisme d'accumulation de liquide dans les vésicules cérébrales. Ce liquide provient en dernière ligne du grand dépôt d'eau existant dans le blanc d'œuf. La vascularisation des vésicules cérébrales est étudiée à l'aide des injections d'encre de Chine.

Le 2e jour d'incubation, on incise le plafond mince du rhombencéphale, en rendant ainsi possible la communication des espaces épendymaires avec les espaces extra-embryonnaires.

Cette intervention exclut l'accumulation sous tension de quantités plus grandes de liquide dans le mésencéphale et le prosencéphale. On constate, dans tous les cas où le rhombencéphale reste ouvert, d'importantes déformations du mésencéphale et un retard dans la croissance du prosencéphale. Ces expériences démontrent l'importance de la tension du liquide épendymaire pour la différenciation des vésicules cérébrales.

LA DESTRUCTION DU PROSENCÉPHALE ET DU MÉSENCÉPHALE DES EMBRYONS DE POULET AU BOUT DE 30 À 45 HEURES D'INCUBATION

L'embryon peut survivre à cette opération. On obtient des embryons «bulbaires» chez lesquels ne persiste de l'encéphale que le bulbe. Ces embryons bulbaires sont donc dépourvus du reste du cerveau, de l'hypophyse et de l'épiphyse, des globes oculaires et du massif facial. On a pu obtenir la survie de ces embryons jusqu'à 14 jours après l'opération. Ces embryons présentent toujours une célosomie et un retard de croissance par rapport aux témoins.

LA DESTRUCTION DU GLOBE OCULAIRE

La destruction, par thermocoagulation, du globe oculaire, le second jour d'incubation est toujours suivie de la malformation du massif facial dite «bec croisé». Dans les cas opérés, la voie optique correspondante est absente.

La tension du globe oculaire s'avère donc être un facteur mécanique nécessaire pour le développement normal du massif facial. L'absence unilatérale de ce facteur conduit à la malformation susmentionnée.

TROISIÈME PARTIE

RECHERCHES SUR LA BIOLOGIE DES HÉTÉROGREFFES

Dans ce chapitre, on aborde expérimentalement le problème du type d'ontogénèse. On étudie le comportement des organes embryonnaires (dans ce cas, le tégument) des espèces nidicoles dans les conditions de leur transplantation sur des embryons appartenant aux espèces nidifuges et inversement.

Des fragments de tégument provenant de l'embryon de pigeon (type nidicole, race pigmentée) âgé de 7 à 8 jours, sont transplantés de manière orthotope sur l'embryon de Leghorn (espèce appartenant au type d'ontogénèse nidifuge) à 3 jours d'incubation.

On étudie la croissance des implants, le comportement des mélanoblastes (respectivement des promélanoblastes), notamment leur diffusion de l'implant à l'hôte, la transformation des promélanoblastes en mélanoblastes colorés.

L'innervation et la vascularisation des implants sont étudiées à l'aide des imprégnations argentiques et de l'injection des vaisseaux avec de l'encre de Chine.

On étudie au préalable les facteurs de croissance et de différenciation dans le tégument de l'embryon d'oiseau. On passe ensuite à l'étude proprement dite des hétérotransplants de tégument.

Particulièrement intéressant est le comportement des promélanoblastes de pigeon, diffusés dans les hôtes Leghorn.

Comme on le sait, les embryons des races colorées de pigeon sont presque non pigmentés, possédant un tégument avec seulement des promélanoblastes (ou presque). Les implants de tels téguments se développent bien dans l'hôte Leghorn, mais restent non-pigmentés. En ce qui concerne les promélanoblastes, qui immigrent de l'implant dans le tégument de l'hôte, ils s'y transforment en mélanoblastes colorés. On obtient le même résultat avec le tégument embryonnaire de perroquet (action d'un ferment local — tégumentaire — probablement la pyrocatéchinase).

Chez l'hôte nidifuge, le pigment du nidicole apparaît donc beaucoup plus vite que normalement.

Cette accélération s'avère être également en fonction de la maturation des terminaisons nerveuses, tégumentaires de l'hôte. Les combinaisons de tégument Leghorn et pigeon dans la culture de tissu ou sur la membrane chorio-allantoïdienne (donc dans des milieux sans innervation) ne présentent jamais cette mélanisation précoce.

La transplantation inverse, c'est-à-dire du tégument d'une race pigmentée nidifuge (par exemple la race de poulet Plymouth) sur un hôte nidicole (pigeon) démontre l'absence de diffusion des mélanoblastes Plymouth dans le tégument de l'hôte.

Pendant que le tégument des gallinacées accepte les mélanoblastes ou les promélanoblastes, le tégument du pigeon les repousse.

Les recherches démontrent que le type d'ontogénèse (nidifuge — nidicole) imprime son spécifique aux plus fins détails du processus de développement dès le début de l'ontogénèse.

On constate en général que les transplantations permettent non seulement une compensation des pertes de tissus ou de fonctions (transplant «de substitution»), mais qu'elles peuvent conférer à l'hôte des propriétés nouvelles. En ce sens on peut distinguer des hôtes qui acceptent et des hôtes qui n'acceptent pas les éléments diffusables d'une greffe.

QUATRIÈME PARTIE

RECHERCHES SUR LES FONCTIONS DE QUELQUES ORGANES EMBRYONNAIRES

Les recherches traditionnelles d'embryo-physiologie étendent l'étude des fonctions des organes adultes — complètement différenciés — sur la période prénatale ou pré-éclosionnelle et suivent les manifestations de ces fonctions à des phases ontogénétiques de plus en plus précoces, jusqu'à leurs débuts.

Ainsi, l'un des problèmes de l'embryo-physiologie consiste à établir le moment de «d'apparition» chez l'organe embryonnaire de la fonction spécifique, plus ou moins semblable à celle de l'organe adulte. Un autre aspect de ces recherches consiste à établir le rapport entre la différenciation morphologique et l'installation de cette fonction spécifique.

Toutes ces recherches prennent donc comme point de départ — selon le point de vue exposé — l'organe adulte et suivent — en quelque sorte en sens rétrograde — la fonction bien connue du substratum différencié adulte, aux stades de plus en plus précoces de l'embryon, s'arrêtant aux premiers signes de sa manifestation.

W. Roux a élaboré le schéma général connu des phases que parcourt — selon cet auteur — tout organe au cours de l'ontogénèse. L'organe traverserait — selon Roux — une première période afonctionnelle ou préfonctionnelle, pendant laquelle le développement aurait lieu sur la base de l'hérédité ; l'organe entrerait ensuite dans sa période fonctionnelle, quand il est modelé par les stimuli fonctionnels, donc par son processus fonctionnel même. D'après Roux, le développement et même le maintien de l'organe dépendent pendant cette période, en premier lieu, de l'exercice de sa fonction spécifique (la période de l'apparition de la structure fonctionnelle).

L'ébauche de chaque organe embryonnaire traverserait donc, conformément à cette conception, une première période «préfonctionnelle» manifestant des processus morphogénétiques fondamentaux, jusqu'au moment de l'apparition de la différenciation histologique, qui coïncide plus ou moins avec le début de la phase «fonctionnelle».

La conception de W. Roux sur la période «préfonctionnelle» est caractérisée par une séparation entre la forme et la fonction à une certaine époque de l'ontogénèse, rendant possible, pour toute une période, le développement de formes et de structures considérées afonctionnelles et séparant ainsi les facteurs du développement morphologique des fonctions des ébauches d'organes et des organes de l'embryon. Ceci paraît d'autant plus étrange que W. Roux est connu comme l'un des plus âpres défenseurs de l'idée de la relation entre la forme et la fonction.

Une conception matérialiste-dialectique du développement ontogénétique ne permet pourtant pas d'admettre l'existence de phases préfonctionnelles, dans lesquelles le développement serait séparé de la fonction.

Si l'on cherche les causes du développement individuel dans les interactions qui s'élaborent au sein du complexe ontogénétique et si l'on considère l'effet de ces interactions comme manifestation de la réactivité de la substance vivante, réactivité qui se modifie quantitativement et qualitativement à travers les stades ontogénétiques, on ne peut séparer les fonctions des ébauches embryonnaires, des interactions que ces dernières entretiennent entre elles.

Comme nous l'avons déjà dit, il y a un développement incessant de ces interactions et, par conséquent, des fonctions des organes embryonnaires le long des différentes phases de développement, conduisant en dernière ligne et à des périodes qui diffèrent d'un organe à l'autre (et d'une espèce à l'autre) à ce qu'on appelle le «seuil fonctionnel adulte», c'est-à-dire à l'apparition des fonctions spécifiques de l'organe complètement développé.

«Le seuil fonctionnel adulte» n'est donc pas une borne qui séparerait une période, afonctionnelle d'une période fonctionnelle, mais il est le point critique d'un changement qualitatif fonctionnel. Ces moments critiques, se rattachant à des transformations du type de métabolisme, sont dans beaucoup de cas — par exemple chez l'embryon de poulet — en corrélation avec des phénomènes tels que : développement de la circulation vitelline, passage à l'hématose par la circulation allantoïdienne, formation du liquide sous-embryonnaire par le transfert de l'eau du blanc d'œuf dans le vitellus, etc.

L'ontogénèse embryonnaire connaît de cette manière une série de périodes de transition, au cours desquelles interviennent des changements des conditions de développement.

On étudie ces périodes de transition non seulement pour leur importance dans la recherche du développement des fonctions des organes embryonnaires, mais aussi pour trouver par cette voie (en vertu de la conception de V. Mitchourine) des moyens pour acheminer l'évolution de l'ontogénèse dans des voies nouvelles, en modifiant les conditions de développement au cours de ces périodes.

La conception mitchourinienne admet la possibilité de l'ébranlement de l'hérédité par de telles interventions.

Nous ne pouvons pas admettre des organes embryonnaires préfonctionnels ou afonctionnels. Jusqu'à ce que le seuil morphofonctionnel adulte soit atteint, les organes embryonnaires peuvent avoir des interrelations et des fonctions qui diffèrent quantitativement et qualitativement des fonctions définitives.

L'organe embryonnaire est toujours le résultat nécessaire des interactions de tout le complexe embryonnaire et, à son tour, un facteur dans ce complexe, manifestant de

cette manière sa fonction. Ainsi, chaque organe embryonnaire parcourt plusieurs phases fonctionnelles jusqu'à l'apparition de la fonction spécifique, c'est-à-dire semblable à celle de l'organisme complètement développé.

Les fonctions indispensables à la vie et au développement de l'embryon peuvent avoir deux espèces de correspondants morphologiques.

1. Organes à développement *unitaire*, qui persistent comme tels, depuis le début jusqu'à la fin de l'ontogénèse, s'adaptant continuellement aux nécessités du complexe embryonnaire, comme par exemple : le cœur, le foie.

2. Complexes d'organes affectés à des fonctions similaires, mais représentés par des composants séparés topographiquement et, dans certains cas, très différents au point de vue morphologique, qui arrivent à leur période fonctionnelle, spécifique, à différentes périodes du processus ontogénétique, appartenant pourtant au même complexe fonctionnel.

Nous pouvons désigner ces organes par le nom d'homéofonctionnels, car ils se trouvent au service de la même fonction.

Nous pouvons citer, comme exemple du couple homéofonctionnel, la chorio-allantoïde et le poumon.

A partir du 8e jour d'incubation, le principal organe respiratoire de l'embryon d'oiseau est la chorio-allantoïde. Elle coexiste pourtant avec l'autre organe respiratoire, le poumon, qui se différencie lentement à travers l'ontogénèse embryonnaire et aboutit à sa fonction spécifique «adulte» peu avant l'éclosion, quand l'embryon commence à respirer l'air de la chambre à air. C'est à ce moment-là que commence la régression de la chorio-allantoïde.

Dans l'exemple cité, les deux partenaires du couple homéofonctionnel sont des organes différents, topographiquement éloignés, l'un intra- et l'autre extra-embryonnaire.

Dans le cas du méso- et du métanéphros, il s'agit d'une succession (au cours du temps et dans l'espace) de supports des fonctions excrétoires, topographiquement séparés. Mais ici, la succession a lieu plus tôt, au cours de l'ontogénèse embrionnaire pré-éclosionnelle, et les deux partenaires du couple appartiennent au corps embryonnaire.

Indifféremment si nous considérons toute la masse néphrogène (pro-, méso- et métanéphros) comme un «holonéphros» unique, qui se différencie successivement dans la direction cranio-caudale, ou si nous considérons les trois générations de reins comme des formations indépendantes, il s'agit dans les deux cas — à l'encontre du foie, du cœur, etc. — d'une séparation au cours du temps et dans l'espace, des organes qui exécutent des fonctions homologues et se succèdent dans le processus de développement ontogénétique.

Ce qui est important c'est que le méso- et le métanéphros ne se substituent pas strictement et coexistent à un moment donné, formant un couple simultané composé d'un organe excréteur, qui fonctionne en plein et qui est adapté aux exigences actuelles du complexe embryonnaire (le mésonéphros), et d'un second organe (le métanéphros), qui coexiste, qui est topographiquement séparé du premier, mais qui n'est pas encore arrivé à sa différenciation spécifique. Ce couple passe ensuite aussi par une phase de fonction spécifique simultanée des deux partenaires.

On a choisi comme objet d'étude un couple homéofonctionnel, au sens exposé plus haut, notamment le couple méso-métanéphros car, selon l'avis de l'auteur, un complexe d'organes embryonnaires de ce type présente, pour la recherche expérimentale, des avantages spéciaux comparativement aux organes «uniques» du type cœur, foie, etc.

L'expérimentation avec un tel couple d'organes pourrait conduire à l'élaboration d'une méthodologie utile pour l'analyse des processus ontogénétiques, qui contribue à la différenciation d'un organe embryonnaire dans la présence de son partenaire homéofonctionnel précurseur, mais parfaitement suffisant par rapport aux exigences du complexe embryonnaire.

Le fait que, dans le couple étudié, des phases ontogénétiques morpho-fonctionnelles différentes sont réparties simultanément sur des organes différents, topographiquement séparés, offre en effet à l'expérimentation une surface d'attaque favorable.

On étudie dans ce chapitre les caractéristiques morphofonctionnelles, du méso- et du métanéphros, le long de l'ontogénèse embryonnaire, en utilisant plusieurs méthodes capables de mettre en évidence les aspects fonctionnels des deux générations de reins.

Les recherches effectuées permettent d'affirmer que des signes incontestables de fonction spécifique existent dans le métanéphros dès le 6ᵉ jour d'incubation. L'accumulation du trypan bleu dans les cellules des tubes contournés du mésonéphros, à cette date, dénote une fonction spécifique rénale. On sait que l'accumulation du trypan est caractéristique aux tubes contournés des vertébrés. Par la présence des sphérolithes d'acide urique, l'élimination de cette substance est indubitable à partir du 6ᵉ jour d'incubation.

La présence de la phosphatase alcaline au niveau de la membrane apicale des cellules des tubes contournés, la présence de glycogène au pôle apical et au pôle basal, des mêmes cellules, démontrent qu'à partir du 5ᵉ jour d'incubation les cellules des tubes contournés remplissent la fonction de résorption de la glycose et sa mise en réserve sous forme de glycogène.

Cette période (5—6 jours) d'incubation coïncide avec l'apparition d'une fluorescence spontanée dans le mésonéphros, constatée et étudiée à l'aide de l'examen à la lumière ultraviolette filtrée (Wood).

Nous constatons donc qu'entre le 5ᵉ et le 6ᵉ jour d'incubation, le mésonéphros présente indiscutablement des fonctions caractéristiques rénales. Le mésonéphros a abouti, pendant cette période, à la possibilité d'exercer ses fonctions spécifiques. A ces fonctions, correspond aussi l'aspect du chondriome, qui a commencé à s'orienter vers la forme de bâtonnets au pôle basal des cellules des tubes contournés.

Le métanéphros n'est pas encore morphologiquement distinct à cette période.

Le comportement des épithéliums à l'égard du trypan bleu, la réaction de la phosphatase alcaline, la fluorescence propre et les aspects du chondriome nous permettent d'affirmer que les fonctions rénales du mésonéphros s'intensifient quantitativement, atteignant un plateau entre le 8ᵉ et le 9ᵉ jour d'incubation. Au cours de cette période, le métanéphros est esquissé morphologiquement, sous l'aspect de tubes dont la structure histologique contraste nettement avec celle du mésonéphros : lumière étroite et petites cellules basophiles, tandis que dans le mésonéphros les glomérules sont grands, la lumière des tubes est large et les cellules sont acidophiles.

Au cours de cette période d'intense activité du mésonéphros, le métanéphros coexiste morphologiquement, mais il ne manifeste encore aucune de ses fonctions spécifiques : l'absence d'accumulation de trypan, l'absence de sphérolithes d'acide urique, de phosphatase, de glycogène, de fluorescence propre.

Le couple homéofonctionnel méso-métanéphros est caractérisé par l'existence d'un partenaire en pleine activité spécifique, tandis que le second partenaire se trouve à l'état de différenciation morphologique, sans manifester les fonctions spécifiques. Ceci ne signifie pas l'absence totale de fonction du métanéphros en ce moment ; des recherches ultérieures viseront à élucider le type de fonction remplie par cet organe pendant cette période. Elle peut différer qualitativement des fonctions spécifiques rénales.

La première épreuve fonctionnelle positive qui apparaît dans le métanéphros consiste en la réaction de la phosphatase alcaline et la présence du glycogène dans les cellules des tubes contournés, le 11ᵉ jour d'incubation, avant l'apparition des autres manifestations fonctionnelles spécifiques. Par conséquent, nous considérons la présence de la phosphatase alcaline comme un phénomène précurseur de l'installation des fonctions spécifiques de l'organe. Les fonctions spécifiques apparaissent dans la succession suivante : l'accumulation du bleu de trypan, minimum le 13ᵉ jour, est nette le 14ᵉ jour d'incubation ; les cristaux d'acide urique apparaissent le 13ᵉ jour ; la fluorescence, faible le 13ᵉ jour, est évidente le 14ᵉ jour ; l'injection intraveineuse d'indigo-carmin faite au bout du 14ᵉ jour d'incubation permet clairement d'apprécier simultanément la capacité de concentration et d'élimination du couple méso-métanéphros. Elle est intense chez le mésonéphros et seulement esquissée chez le métanéphros.

Le rapport entre le méso- et le métanéphros change au cours de cette période par rapport à la première période décrite. Les deux partenaires présentent maintenant des signes de fonction spécifique (nous ne savons pas si ces fonctions sont remplies identiquement, mais nous savons qu'elles sont remplies par les deux partenaires). Ces différences se manifestent par les aspects différents des granules de bleu de trypan et de l'élimination

d'acide urique. Les granules sont grands dans le mésonéphros, fins et sous forme de courts bâtonnets, dans le métanéphros. Les sphérolithes sont grands et orientés en rangs qui moulent les canaux excréteurs, tandis que dans le métanéphros, ils sont plus petits, plus denses et plus réduits comme nombre.

Le développement de la fonction spécifique du métanéphros coïncide avec le commencement de la régression du mésonéphros, qui se manifeste par l'invasion de macrophages et l'accumulation d'épithéliums desquamés dans la lumière du tube.

L'aspect du couple méso-métanéphros indique le début d'une période de passage dans la structure métabolique du complexe embryonnaire, qui se manifeste morphofonctionnellement dans les deux organes rénaux coexistants. Bien que le mésonéphros continue de manifester ses fonctions spécifiques, le processus de dégénérescence prend de plus en plus d'ampleur, tandis que le métanéphros manifeste des signes fonctionnels de plus en plus accentués.

En dehors de l'étude du complexe homéofonctionnel mésonéphros-métanéphros, le chapitre contient encore des observations sur un autre couple homéofonctionnel, formé, d'un côté, du foie embryonnaire et, de l'autre côté, de la membrane vitelline de l'endoderme vitellin et du vitellus sous-jacent, considéré comme un «foie transitoire».

Dans le cadre de la recherche des degrés fonctionnels que parcourent les différents organes jusqu'à ce qu'ils atteignent la fonction spécifique («le seuil fonctionnel adulte»), on peut mentionner également des observations sur les phénomènes de sécrétion constatés dans la muqueuse gastrique de l'embryon de poulet vers le 11e jour d'incubation, sécrétions mérocrines qui sont en relation avec la digestion du blanc d'œuf absorbé par l'embryon à cette époque.

On peut encore mentionner des phénomènes de sécrétion des epithéliums bronchiques embryonnaires qui rendent le poumon embryonnaire semblable à une glande à sécrétion externe. Nous ne connaissons pas encore le sort de ces sécrétions et la fonction préadulte correspondant au poumon embryonnaire.

A PROPOS DES FONCTIONS MÉCANIQUES DE CERTAINS ORGANES EMBRYONNAIRES

Pendant le développement de l'embryon, apparaissent des forces mécaniques (pressions, tensions, tractions, etc.) qui interviennent comme facteurs actifs au processus de développement. L'auteur observe la présence d'une tension longitudinale qui se manifeste dans le corps de l'embryon de poulet le 2e jour d'incubation et qui se rattache à la différenciation des organes axiaux ; cette tension contribue à la fermeture du tube neural.

Elle est suivie, le 3e jour, d'une tension transversale, qui favorise, par exemple, la persistance d'une réouverture du tube neural.

On étudie dans ce chapitre l'effet des contractions rythmiques du cœur, transmises au mésenchyme avoisinant.

C'est à ces tractions qu'est due la différenciation des premiers éléments élastiques. La sollicitation de la réactivité du mésenchyme par des tractions rythmiques provoque la différenciation du tissu élastique comme réponse adéquate.

Il ressort des recherches exposées qu'entre le 3e et le 6e jour d'incubation apparait chez l'embryon de poulet une formation composée de fibrilles contenant des granulations avec des réactions tinctoriales, caractéristiques au tissu élastique, formation qui entre dans la constitution du septum aorto-pulmonaire, acquiert des connexions avec les fibrilles élastiques pariétales de l'aorte et de l'artère pulmonaire et disparaît le 7e jour d'incubation.

La formation élastique décrite est une sorte d'organe embryonnaire transitoire, le précurseur du tissu élastique des grands vaisseaux. Ce « noyau primitif élastique » apparaît dans le corps de l'embryon dans l'unique région existante à cette date de l'ontogénèse, qui subit des sollicitations mécaniques rythmiques. Le tissu élastique apparaît d'abord sous la forme de « granules » à l'intérieur de certaines fibrilles encore non différenciées dans le sens de l'ultrastructure élastique.

CINQUIÈME PARTIE

RECHERCHES SUR CERTAINES INTERRELATIONS DES COMPOSANTS DU COMPLEXE EMBRYONNAIRE

A PROPOS DES INTERRELATIONS DU CORPS DE L'EMBRYON, DU LIQUIDE SOUS-EMBRYONNAIRE, DU SAC VITELLIN, DE L'ALLANTOÏDE ET DE L'AMNIOS

Les interactions qui se développent entre le corps de l'embryon, d'une part, le blanc d'œuf, le sac vitellin, l'amnios, l'allantoïde et la coquille calcaire, de l'autre, ont une grande importance pour la compréhension de l'ontogénèse de l'embryon d'oiseau et surtout pour l'élaboration de méthodes pour diriger la marche de l'ontogénèse.

On discute la classification par stades de l'ontogénèse pré-éclosionnelle de l'embryon de poulet, proposée par G. A. Schmidt et M. N. Ragozina, et on passe ensuite à l'exposition des *interrelations du corps de l'embryon et du sac vitellin.*

Le chapitre contient des recherches descriptives et expérimentales sur l'organe hématopoïétique du sac vitellin. Après la mobilisation des îles sanguines de type Wolff et Pander, dans la paroi du sac vitellin, le long des vaisseaux vitellins, apparaissent de nouveaux foyers hématopoïétiques constituant l'organe hématoformateur extra-embryonnaire le plus important.

On étudie cet organe à l'aide des injections capillaires d'encre de Chine, de la réaction des pseudo-péroxydases des centres hématopoïétiques et par l'examen *in vivo* de la surface du sac vitellin, à l'aide du microscope ultra-opaque.

On décrit le développement des capillaires hématopoïétiques juxta-artérielles, leur relation avec le réseau des vaisseaux vitellins, la formation des plis hémato-poïétiques de l'endoderme vitellin.

Dans la partie expérimentale des recherches ces foyers hématopoïétiques sont soumis à l'action des rayons ultra-violets. On obtient des nécroses des foyers hématopoïétiques et on observe des phénomènes de régénération de ces derniers. On obtient des dispositions anormales des vaisseaux vitellins.

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES SUR L'EFFET DE L'INTERRUPTION DE LA CONNEXION VASCULAIRE ENTRE LE CORPS DE L'EMBRYON ET L'AIRE VASCULAIRE EXTRA-EMBRYONNAIRE

Les îles sanguines de Wolff et Pander peuvent se développer, comme on le sait, aussi en l'absence du corps de l'embryon ou après l'interruption expérimentale de la connexion vasculaire entre le cœur de l'embryon et l'aire vasculaire extra-embryonnaire. De telles aires vasculaires restent bien entendu privées de circulation. Les recherches de ce chapitre s'occupent de l'analyse de l'hématopoïèse dans de telles aires dépourvues de circulation et, d'autre part, du sort du corps embryonnaire demeuré sans liaison avec le système hématopoïétique extra-embryonnaire et avec la circulation vitelline.

On a pu observer jusqu'au 10e jour d'incubation des aires dépourvues de circulation et on a pu étudier le mode de comportement des cellules hématoformatrices dans ces conditions. On a pu faire des observations sur la pénétration des globules vitellins dans la lumière des vaisseaux de la circulation vitelline et sur la participation des éléments vitellins à la circulation sanguine vitelline.

En ce qui concerne le corps proprement dit de l'embryon, on peut constater que la croissance en direction axiale, la différenciation des somites progressent un certain temps même après la cessation de la circulation vitelline. On décrit des déviations de l'état normal observées dans ces conditions.

L'auteur considère les aires sanguines dépourvues de circulation comme modèle expérimental utile pour l'analyse des facteurs actifs dans le processus de la formation et de la maturation des cellules sanguines.

La méthode de «l'aire sans circulation» peut être également utilisée pour faire des tests sur la valeur biologique de certaines substances capables d'influencer le processus d'hématopoïèse.

Suit une étude sur :

La circulation allantoïdienne, où l'on étudie la structure fonctionnelle des vaisseaux allantoïdiens à l'aide des injections d'encre de Chine et à l'aide de l'observation vitale.

RECHERCHES SUR LE LIQUIDE SOUS-EMBRYONNAIRE

Un phénomène important, qui, pendant 2—3 jours, modifie de manière fondamentale les rapports entre le blanc d'œuf et le vitellus, est constitué par la formation et l'accumulation du liquide sous-embryonnaire. La formation de ce liquide commence pendant les premières heures d'incubation et atteint un maximum d'intensité entre le 3e et le 6e jour. On étudie dans ce chapitre la période à partir du 3e jour d'incubation, quand le processus devient particulièrement intense. On a effectué trois groupes d'expériences :

a) Expériences concernant l'établissement des rapports quantitatifs entre le blanc d'œuf, le vitellus et le liquide sous-embryonnaire, aux différentes étapes du développement.

b) Expériences concernant la provenance du liquide sous-embryonnaire du blanc d'œuf, et

c) Modifications expérimentales du processus de formation de ce liquide.

On présente des preuves expérimentales sur le fait que la plupart de la quantité d'eau contenue dans le liquide sous-embryonnaire résulte d'un transfert d'eau du blanc d'œuf dans l'espace sous-embryonnaire et que les membranes extra-embryonnaires y jouent un rôle actif.

Un rôle important dans ce processus revient aussi à la différence de pression osmotique entre le vitellus et le blanc d'œuf.

RECHERCHES SUR LA COMPOSITION DU LIQUIDE SOUS-EMBRYONNAIRE

On a exécuté des analyses chimiques et physico-chimiques du liquide sous-embryonnaire au cours des différentes phases de développement. Les résultats sont consignés dans des tableaux.

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES SUR L'EFFET DE L'INJECTION DE LIQUIDE SOUS-EMBRYONNAIRE SUPPLÉMENTAIRE DANS LA VÉSICULE ALLANTOÏDIENNE

Le transfert d'eau, du blanc d'œuf dans le sac vitellin, constitue chez les sauropsidés une importante adaptation à la vie terrestre. Les recherches de ce chapitre s'occupent de l'effet d'une injection unique de 2 cm³ de liquide sous-embryonnaire dans la cavité de la vésicule allantoïdiene de l'embryon de poulet. L'embryon reçoit de cette manière un surplus d'eau et de substance active de ce liquide.

On a constaté que les poussins éclos, traités de cette manière le 5e jour d'incubation, présentaient dans la plupart des cas des poids supérieurs à ceux des témoins. L'observation de plusieurs générations successives, obtenues du lot expérimental, a montré la tendance au maintien des surpoids à l'éclosion, ce qui permet d'obtenir — par sélection — des animaux adultes particulièrement bien développés et une augmentation successive du poids des œufs.

EXPLICATION DES FIGURES

Fig. 1. — Bases du concept général du complexe ontogénétique. *a, b, c, d, e*) générations successives, dans leur continuité matérielle. L'«enveloppe» extérieure : continuité des conditions et facteurs de milieu nécessaires à la vie et au développement. Flèches verticales = facteurs « actuels » qui interviennent dans l'ontogénèse. Flèches horizontales = succession phylogénétique (historique) des facteurs.

Fig. 2. — Schéma topographique des éléments constitutifs du complexe embryonnaire.

Fig. 3. — Schéma représentant le principe de systématisation, basé sur l'existence des étages ou niveaux de structure.

Fig. 4. — Diverses étapes d'intériorisation : relations entre les sphères du complexe ontogénétique.

Fig. 5. — Systèmes d'interrelations dans le cas des transplantations.

Fig. 6. — Aspects d'un élevage.

Fig. 7. — Poulailler avec nids pièges.

Fig. 8. — Boxe de travail dans le laboratoire d'embryologie expérimentale.

Fig. 9. — Table de travail pour la fénestration des œufs.

Fig. 10. — Schéma de l'ovoscope simple.

Fig. 11. — Arrangement de l'œuf en vue de la fenestration. x=point culminant enregistré dans le thermostat.

Fig. 12. — Fenestration de l'œuf. L'œuf est placé sur son support, portant le signe du « point culminant » sur la coquille. On pratique, à l'aide d'un stylet, un orifice ponctiforme à proximité du pôle pointu.

Fig. 13. — On extrait à la seringue 1 ml de blanc d'œuf.

Fig. 14. — On ferme l'orifice avec de la cire.

Fig. 15. — On excise un carré de coquille à l'aide d'une lime.

Fig. 16. — Même opération exécutée à l'aide d'une fraise dentaire.

Fig. 17. — On enlève le carré de coquille, laissant intacte la membrane papyracée.

Fig. 18. — La membrane papyracée dénudée.

Fig. 19. — Incision de la membrane papyracée.

Fig. 20. — On enlève la membrane papyracée.

Fig. 21. — Disposition d'un cadre de paraffine-cire autour de l'orifice pratiqué dans la coquille.

Fig. 22. — Même explication que pour la figure 21.

Fig. 23. — L'orifice est fermé au moyen d'une lame chauffée.

Fig. 24. — L'œuf fenestré a été fermé.

Fig. 25. — Introduction des œufs fenestrés dans l'incubateur.

Fig. 26. — Dispositif d'observation et d'opération.

Fig. 27. — Schéma du microthermostat pour les œufs et du microscope ultra-opaque.

Fig. 28. — Microscope ultra-opaque et thermostat pour les œufs.

Fig. 29. — Microscope ultra-opaque avec le dispositif photographique et microthermostat pour les œufs.

Fig. 30. — Mode d'observation de l'embryon vivant à l'aide du microscope ultra-opaque et du thermostat pour les œufs.

Fig. 31. — Intérieur du microthermostat.

Fig. 32. — Dispositif d'Olga B. Lépéchinskaïa pour l'observation de l'embryon vivant à l'aide du microscope ultra-opaque (Dans O. B. Lépéchinskaïa, *Origine des cellules de la substance vivante*, Ed. de l'Académie de la R.P.R.).

Fig. 33. — Dispositif de Lépéchinskaïa-Lapissova pour l'observation vitale de la surface de la plaque embryonnaire (Dans O. B. Lépéchinskaïa, *Origine des cellules de la substance vivante*, Ed. de l'Académie de la R.P.R.).

Fig. 34. — Dispositif de V. I. Sorokine pour l'examen vital de la plaque embryonnaire (Dans : *Nouvelles données dans le problème du développement des formes cellulaires et non cellulaires de la substance vivante*), Medguiz, 1954.

Fig. 35. — *a*) Dispositif pour l'examen des organes embryonnaires à la lumière ultra-violette filtrée ; *b*) irradiation de l'embryon aux rayons ultra-violets.

Fig. 36 — Mésonéphros de l'embryon de poulet de 7 jours. Photographie à la lumière de Wood.

Fig. 37. — Cellules embryonnaires, à coloration vitale au rouge neutre. La coloration a mis en évidence des inclusions cytoplasmatiques, des gouttes lipidiques.

Fig. 38. — Image du tube neural et des somites. Embryon vivant, au bout de 50 heures d'incubation, après coloration vitale au bleu de Nil.

Fig. 39. — Coloration vitale de l'embryon à l'aide du porteur de colorant d'agar. Embryon de 3 jours. Le porte-colorant d'agar — au bleu de Nil — est déposé sur le corps de l'embryon, ne laissant découvertes que la tête et une partie de la portion caudale du corps embryonnaire. Les dimensions du porte-colorant sont exagérées, en vue de la démonstration. Photographie prise par la fenêtre pratiquée dans la coquille de l'œuf.

Fig. 40. — Même embryon, au bout de 10 minutes. Le porte-colorant a été eloigné. La région à coloration vitale, nettement délimitée, contraste avec les portions pâles, restées non colorées. On reconnaît : les somites, le tube neural, les plis amniotiques, le tube cardiaque, etc.

Fig. 41. — Même embryon (image à un plus fort grossissement). On remarque la finesse des contours des organes à coloration vitale.

Fig. 42. — Schéma de l'œuf « transvasé ».

Fig. 43. — Aspect de l'embryon transvasé, le septième jour d'incubation. *a*) L'allantoïde couvre l'embryon, enveloppé dans l'amnios ; l'immersion des vaisseaux vitellins ; *b*) même embryon, image à un plus fort grossissement.

Fig. 44. — Chambre humide pour l'observation vitale et l'humectation continuelle de l'embryon et de son aire vascutaire extraite de l'œuf. La formation embryonnaire se place sur la convexité du verre de montre, que l'on voit à l'intérieur du cristallisoir. Sur le couvercle de ce dernier, on voit le dispositif d'humectation.

Fig. 45. — Intérieur du microthermostat « de lame ». Mode d'introduire la lame avec la culture de tissu ou la plaque embryonnaire vivante dans le microthermostat.

Fig. 46. — Microscope muni d'une chambre photographique, à miroir de réfléchissement, et microthermostat « de lame ».

Fig. 47. — *a*, *b* et *c*) Représentation schématique des techniques opératoires en fonction des étages structuraux ; *c*) *I* et *II*, voies d'intervention afin de diriger l'ontogénèse : *I*. interventions dans la structure du milieu externe ; *II*. interventions directes dans la sphère du métabolisme.

Fig. 48. — Confection des micro-instruments de verre.

Fig. 49. — Obtention du tube en verre.

Fig. 50. — Confection des micro-instruments.

Fig. 51. — Confection du crochet.

Fig. 52. — Le crochet et l'instrument mousse.

Fig. 53. — Confection de l'instrument mousse.

Fig. 54. — Installation d'électro-thermocautérisation. Résistance réglable, instruments de cautérisation, champ opératoire mobile, binoculaire avec la chambre photographique et le viseur « miflex ».

Fig. 55. — Résistance réglable et cautère.

Fig. 56. — Installation de micro-électrolyse. Le pôle inactif, alimenté par un courant uniforme produit par une batterie, est tenu à la main. On voit le voltmètre et le convertisseur.

Fig. 57. — Dispositif d'observation et d'opération ; manière de tenir l'instrument opératoire à la main.

Fig. 58. — *a*) Dispositif pour opérations à instrument fixe et champ mobile ; *b*) détails.

Fig. 59. — Dispositif d'opération à champ mobile et instrument fixe. → vis de manœuvre.

Fig. 60. — Dispositif d'opération et d'électrocautérisation. Les instruments sont montés sur les bras du micromanipulateur. Chambre photographique sur l'un des oculaires du binoculaire. Illumination latérale.

Fig. 61. — Même installation. Autre vue.

Fig. 62. — Détails de la figure précédente. Microcautère de constantan. Les fils d'alimentation sont isolés par une masse plastique.

Fig. 63. — Ecarteurs en verre, montés sur le micromanipulateur.

Fig. 64. — Installation des figures précédentes : autre vue.

Fig. 65. — Détails de la figure 64.

Fig. 66. — Installation pour injections intra-embryonnaires, à canule fixe et champ opératoire mobile. La chambre photographique avec « miflex », montée sur l'un des oculaires du binoculaire, permet d'obtenir des instantanés pendant l'opération.

Fig. 67. — Technique de l'injection dans une veine allantoïdienne. L'œuf transilluminé, le 11e jour d'incubation. *CA* = chambre d'air ; *V* = veines allantoïdiennes, visibles à travers la transparence de la coquille ; V_1= trajet de la veine mise en évidence à travers la membrane papyracée rendue transparente par de l'huile de paraffine, à l'intérieur du volet pratiqué dans la coquille.

Fig. 68.—Manière de pénétrer dans le cœlome extra-embryonnaire par l'ouverture d'un pli amniotique latéral.

Fig. 69. — Embryon de poulet, le 2e jour d'incubation. On voit : le tube neural, les somites, la vésicule otique, le pli amniotique céphalique couvrant partiellement la tête. L'aiguille opératoire dans la position voulue pour l'incision du pli amniotique cranien. Coloration vitale au bleu de Nil.

Fig. 70. — Embryon de poulet au début du 3e jour d'incubation. *A A* = place de la section transversale de la figure 71. Photographié vivant. Coloration vitale au bleu de Nil.

Fig. 71. — Embryon de poulet au début du 3e jour d'incubation. Section transversale, du côté cranial, par rapport à l'émergence des artères vitellines, à peu près au niveau de la ligne *AA* de la figure 70. *a* = membrane vitelline ; *b* = plis amniotiques formés par l'ecto- et le mésoderme ; *c* = cœlome extra-embryonnaire ; *d* = cœlome intra-embryonnaire ; *e* = endoderme ; *f* = vaisseaux vitellins ; *g* = deux aortes ; *h* = corde ; *i* = tube neural ; *j* = somites ; *k* = mésoderme : somatoplèvre et visceroplèvre ; *l* = ectoderme tégumentaire ; *m* = canal de Wolff ; *n* = canalicule segmentaire de l'organe de Wolff (mésonéphros).

Fig. 72. — Opération de myélorachischizis. Coloration vitale de la brèche amniotique.

Fig. 73. — Ouverture de la brèche amniotique.

Fig. 74. — L'amnios est rouvert, ses plis sont écartés latéralement.

Fig. 75. — Opération de myéloschizis. Le tube neural est ouvert à l'aide de l'instrument opératoire.

Fig. 76. — Aspect après la fin de l'opération de la figure 70.

Fig. 77. — Phases de l'opération de myéloschizis (schéma). Incision de la membrane vitelline.

Fig. 78. — Epiderme tégumentaire incisé et enlevé. On ouvre le tube neural avec l'aiguille opératoire.

Fig. 79. — Le tube neural est ouvert.

Fig. 80. — Disposition des deux loupes binoculaires en vue de l'exécution des transplantations embryonnaires.

Fig. 81. — *a)* Tégument embryonnaire de la race de Plymouth, transplanté sur la membrane chorio-allantoïdienne ; *b)* même transplant au bout de 18 heures.

Fig. 82. — *a, b* et *c*) Cœur d'un embryon de poulet de 3 jours, implanté sur l'aire vasculaire vitelline. *V*= Ventricule ; *B* = bulbe ; *MV* = membrane vitelline ; *AV* = aire vasculaire. En *c*, myoblastes répandus sous la membrane vitelline.

Fig. 83. — Micromanipulation. On peut voir : l'aiguille en verre, à droite, et l'anse en platine chauffée, à gauche, les deux montées sur les bras du micromanipulateur.

Fig. 84. — *a, b* et *c*) La manière d'obtenir la pointe de verre pour la micromanipulation.

Fig. 85. — Sectionnement d'un érythrocyte.

Fig. 86. — Micromanipulation. Vue d'ensemble de l'installation. Chambre d'huile, installation photographique.

Fig. 87. — Détails de la chambre d'huile.

Fig. 88. — Microscope Lumipan muni du dispositif photographique, composé d'une chambre à miroir et du viseur « miflex ».

Fig. 89. — Installation pour la photographie de l'embryon vivant *in situ*. Chambre à miroir de réfléchissement, anneaux de prolongement, objectif, illumination latérale.

Fig. 90. — Electrophorèse sur papier. *a)* Sérum d'embryon de poulet à 14 jours d'incubation ; *b)* blanc d'œuf de poule de Leghorn ; *I.* évaluation quantitative (courbe obtenue à l'électrocardioscope) ; *II.* papier de filtre à fractions protéiniques, après le développement.

Fig. 91. — Chromatographie sur papier (bidimensionnelle). Amino-acides de l'hydrolysat de protéines des muscles d'un poussin de 2 jours. *a)* Phénol/H_2O ; *b)* butanol/acide acétique/H_2O.

Fig. 92. — Schéma des étages de structure de l'organisme.

Fig. 93. — Embryon à 24 heures d'incubation. *1.* Membrane vitelline contenant du glycogène ; *2.* globules vitellins contenant du glycogène.

Fig. 94. — Embryon âgé de 5 jours. *1.* Moelle épinière contenant du glycogène ; *2.* myoblastes contenant du glycogène.

Fig. 95. — Cellules sympathiques nerveuses en migration riches en glycogène. Embryon à 5 jours d'incubation.

Fig. 96. — Foie contenant du glycogène chez un embryon à 6 jours d'incubation.

Fig. 97. — Glycogène dans le foie d'un embryon à 10 jours d'incubation. Dessin à la chambre claire.

Fig. 98. — Glycogène dans le foie de l'embryon, à 13 jours d'incubation. Dessin à la chambre claire.

Fig. 99. — Glycogène dans le foie de l'embryon de 5 jours, sous l'action de l'extrait de pancréas embryonnaire âgé de 12 jours d'incubation.

Fig. 100. — Foie surchargé de glycogène sous l'action de la morphine chez un embryon de 13 jours.

Fig. 101. — Réaction de la phosphatase alcaline dans les globules de vitellus à 6 heures d'incubation.

Fig. 102. — Embryon à 2 jours d'incubation. Réaction de la phosphatase alcaline dans le mésodiencéphale, coupe optique et portion ventrale de la moelle épinière.

Fig. 103 — Embryon à 17 jours d'incubation. Réaction de la phosphatase alcaline. *1.* Au niveau du diencéphale ; *2.* à la base des hémisphères cérébraux ; *3.* au niveau du bulbe.

Fig. 104. — Embryon à 13 jours d'incubation. Réaction de la phosphatase alcaline intensément positive. *1.* Au niveau de la moelle épinière ; *2.* au niveau des ganglions rachidiens ; *3.* au niveau des nerfs de la région du métanéphros ; *4.* le métanéphros présente une réaction modérément positive.

Fig. 105. — Réaction de la phosphatase alcaline dans le foie de l'embryon de 10 jours.

Fig. 106. — Réaction de la phosphatase alcaline dans le foie de l'embryon de 13 jours.

Fig. 107. — Réaction de la phosphatase alcaline au niveau de l'hypophyse chez l'embryon de 11 jours.

Fig. 108. — Embryon au bout de 12 jours d'incubation. Réaction de la phosphatase alcaline. *1.* Au niveau de la thyroïde ; *2.* de la parathyroïde ; *3.* du thymus.

Fig. 109. — Embryon de 12 jours. Réaction de la phosphatase alcaline au niveau de la thyroïde.

Fig. 110. — Embryon de 7 jours. Réaction de la phosphatase alcaline au niveau de la surrénale. *1.* Réaction positive dans les cellules nerveuses sympathiques ; *2.* réaction négative au niveau des cordons.

Fig. 111. — Embryon de 12 jours. Réaction de la phosphatase alcaline. *1.* Au nouveau du mésonéphros ; *2.* au niveau du métanéphros.

Fig. 112. — Embryon à 48 heures d'incubation. Vue des formations embryonnaires *in situ*, prise sur le vif, sans coloration vitale. *1.* Aire vasculaire ; *2.* le jaune ; *3.* le blanc ; *4.* la coquille ; *5.* le noyau de Pander ; *6.* l'aire pellucide ; *7.* l'aire opaque ; *8.* tête de l'embryon.

Fig. 113. — Le troisième jour d'incubation ; photographie prise sur le vif. *1.* Aortes dorsales ; *2.* la circulation vitelline (prise sur le vif) ; *3.* le cœur ; *4.* arcs branchiaux artériels ; *5.* veines vitellines ; *6.* l'artère vitelline ; *7.* sinus marginal ; *8.* vaisseaux vitellins latéraux (à droite et gauche) ; *9.* veines vitellines (antérieure et postérieure).

Fig. 114. — Le quatrième jour d'incubation ; photographie prise sur le vif. *1.* La vésicule allantoïdienne ; *2.* les veines cardinales (antérieure et postérieure) ; *3. sinus reuniens* Cuvier *4.* cœur *5.* oreillette ; *6.* ventricule ; bulbe ; *7.* arcs branchiaux artériels ; *8.* aorte dorsale + veine cardinale postérieure ; *9.* vaisseaux vitellins ; *10.* sinus terminal le corps de l'embryon est couché sur son côté droit et recouvert par l'amnios).

Fig. 115. — Cinquième jour d'incubation. On voit le corps de l'embryon à travers l'amnios. *1.* Vésicule allantoïdienne avec ses vaiseaux ; *2.* vaisseaux vitellins. Début du processus d'immersion des artères vitellines Photographie sur le vif.

Fig. 116. — Plaque embryonnaire au bout d'environ 19 heures d'incubation. Préparation totale (acide osmique, glycérine). *1.* Aire opaque, noircie par l'action de l'acide osmique sur les globules vitellins du syncytium vitellin ; *2.* aire pellucide en forme de poire ; *3.* ligne primitive ; *4.* nodule de Hensen ; *5.* prolongement céphalique (on le voit à travers la transparence de l'ectoderme). Au-dessous de l'aire pellucide s'est formé l'espace sous-embryonnaire contenant le liquide sous-embryonnaire.

Fig. 117. — Plaque embryonnaire, au bout d'environ 20 heures d'incubation. Préparation totale. Coloration au carmin, clarification. *1.* Ligne primitive relativement écourtée ; *2.* le nodule primitif apparait ici à communication excentrique vers le sillon neural ; *3.* proamnios (région dépourvue de mésoderme, située avant la tête) ; *4.* protubérances neurales, parmi lesquelles on voit la goutt è e neurale (*5*) ; au fond de cette dernière, comme une ligne fine, la corde dorsale (*6*) ; *7.* bourse sous-céphalique.

Fig. 118. — Embryon au bout de 24 heures d'incubation (quatre somites différenciées). Acide osmique, glycérine. Préparation totale. *1.* Aire opaque avec les îlots sanguins de Wolff-Pander ; *2.* aire pellucide ; *3.* protubérances neurales ; *4.* gouttière neurale partiellement fermée, formant le tube neural au niveau du futur rhombencéphale ; *5.* neuropore antérieur ; *6.* pli amniotique cranien ; *7.* ligne primitive de plus en plus courte et caudale.

Fig. 119. — Embryon au bout de 24 heures d'incubation. Préparation totale. Acide osmique, glycérine. Cinq somites différenciées. *1.* Orifice d'entrée dans la bourse sous-céphalique ; *2.* pli amniotique cranien ; *3.* bord de l'orifice d'entrée dans l'intestin céphalique (pharynx) — ici se trouve l'ébauche du tube cardiaque ; *4.* protubérances neurales ; *5.* corde dorsale ; *6.* somites ; *7.* mésoderme encore non segmenté ; *8.* région de la ligne primitive ; *9.* aire pellucide ; *10.* aire opaque.

Fig. 120. — Embryon au bout de 35 heures d'incubation. Acide osmique, glycérine, préparation totale. *1.* Aire opaque avec les îlots et les sinusoïdes sanguins ; *2.* aire pellucide avec les sinusoïdes sanguins ; *3.* pli amniotique cranien ; *4.* diencéphale avec les vésicules optiques primaires ; *5.* mésencéphale ; *6.* rhombencéphale ; *7.* ectoderme céphalique ; *8.* neuropore antérieur ; *9.* tube cardiaque ; *10.* veine omphalomésentérique ; *11.* orifice d'entrée dans

l'intestin céphalique ; *12.* tube neural ; *13.* somites ; *14.* mésoderme non segmenté ; *15.* mésoderme latéral (région du pro- et mésonéphros).

Fig. 121. — Embryon au bout d'environ 35 heures d'incubation. Acide osmique, glycérine, préparation totale. Même légende que pour la figure précédente. Le tube cardiaque est proéminent à droite.

Fig. 122. — Section à travers la plaque embryonnaire, à 15 heures d'incubation. Ectoderme formé d'un épithelium pluristratifié. Ligne primitive à partir de laquelle s'élend à gauche et à droite le mésoderme. L'endoderme n'y est pas différencié de la masse du mésoderme.

Fig. 123 — Section à travers la plaque embryonnaire, à 15 heures d'incubation. Ligne primitive (continuité entre l'écto-, le méso- et l'endoderme). Mésoderme (il s'élend, sous l'ectoderme, des deux côtés de la ligne primitive Endoderme. Vitellus.

Fig. 124. — Section à travers la plaque embryonnaire, à 15 heures d'incubation. Ectoderme, mésoderme, endoderme, vitellus, ligne primitive ; les cellules du mésoderme forment un réseau spatial mésenchymateux. Le méso- et l'endoderme nettement délimités du vitellus.

Fig. 125. — *a, b, c* et *d*) Sections à travers la plaque embryonnaire à 21 heures d'incubation. Sillon primitif et région de la ligne primitive. *1.* Ecto-, méso- et endoderme, au niveau de l'aire pellucide ; *2.* ecto-, méso- et endoderme, au niveau de l'aire opaque ; cadre vitellin de l'aire opaque ; membrane vitelline (fragmentée = artéfact) ; *d*) l'endoderme se transforme, dans la région de l'aire opaque, en syncytium vitellin (un réseau de cellules endodermiques dans les mailles duquel il y a des éléments vitellins, parmi lesquels on distingue des syngranules, des mégasphères, des globules vitellins à « centre protoplasmique », etc.). Rapport étroit des îlots sanguins (*i*↓) avec le syncy-tium vitellin.

Fig. 126. — *a, b* et *c*) Sections à travers la plaque embryonnaire, à 24 heures d'incubation. Mêmes détails que sur la figure 125. Sillon primitif. Région de la ligne primitive. Ecto-, méso- et endoderme ; l'ectoderme contient des éléments vitellins.

Fig. 127. — Fmbryon au bout de 48 heures d'incubation. Coloration vitale au bleu de Nil. Photographie *sin vivo. a*) Début de la torsion de la tête. Pli amniotique cranien ; vésicule otique (les autres détails comme pour les figures 120 et 121) ; *b*) même image, avec l'instrument opératoire.

Fig. 128. — Plaque embryonnaire à environ 35 heures d'incubation. Préparation totale, réaction des pseudo-peroxydases (benzidine, eau oxygénée glycérine). Aire opaque, aire pellucide ; aire embryonnaire. Dans la région de l'aire opaque, les îlots sanguins de Wolff-Pander sont mis en évidence grâce à la réaction des pseudo-peroxydases.

Fig. 129. — Même légende que pour la figure 128.

Fig. 130. — Embryon, le quatrième jour d'incubation.

Fig. 131. — Embryon, le cinquième jour d'incubation

Fig. 132. — Embryon, le sixième jour d'incubation.

Fig. 133. — Embryon, le septième jour d'incubation.

Fig. 134. — Embryon, le huitième jour d'incubation.

Fig. 135. — Embryon, le neuvième jour d'incubation.

Fig. 136. — Embryon, le dixième jour d'incubation.

Fig. 137. — Embryon, le onzième jour d'incubation.

Fig. 138. — *a*) Le troisième jour d'incubation ; *b*) la même section à plus fort grossissement. *1.* Prosencéphale *2.* rhombencephale (voir son plafond mince) ; *3.* vésicule auditive ; *4.* coupe optique ; *5.* arcs branchiaux artériels ; *6.* veine cardinale antérieure ; *7.* pharynx ; *8.* hypophyse ; *9.* fente branchiale ; *10.* arc branchial 1 ; ecto-, méso- et endoderme vitellin extra-embryonnaire ; amnios ; membrane séreuse.

Fig. 139. — *a*) Embryon de poulet. Début du troisième jour d'incubation. La section transversale par la partie médiane du tronc conduit au cœlome extra-embryonnaire ; accès vers le cœlome intra-embryonnaire ; *b*) la même section, grossie. *1.* Tube neural ; *2* somites ; *3.* corde ; *4.* corps de Wolff ; *5.* aorte ; *6.* ectoderme ; *7.* endoderme ; *8* ; cœlome intra- et *9.* extra-embryonnaire ; *10.* vaisseaux vitellins ; *11.* plis amniotiques ; *12.* membrane vitelline

Fig. 140. — Section longitudinale du tube neural. Imprégnation argentique. Canal épendymaire ; ganglion rachidien (*G. R.*) ; somites (*S*).

Fig. 141. — Fin du quatrième jour d'incubation. Imprégnation argentique. Section parasagittale. *1.* Vésicule auditive ; *2.* rhombencéphale ; *3.* canal endolymphatique ; *4.* complexe acoustico-facial ; *5.* ganglion pétreux (glosso-pharyngien) ; *6.* ganglion noueux (vague) ; *7.* moelle ; *8.* corde ; *9.* sympathique ; *10.* veine cardinale supérieure ; *11.* oreillette ; *12.* membre supérieur ; *13.* œil ; *14.* hypoglosse ; *15.* arc branchial *I* ; *16.* fente branchiale 1 ; *17.* arc branchial *II* ; *18.* fente branchiale 2 ; *19.* arc branchial *III* ; *20.* fente branchiale 3 ; *21.* arc branchial *IV*. *22.* fente branchiale 4 ; *23.* amnios.

Fig. 142. — Fin du quatrième jour d'incubation. Section sagittale, imprégnation argentique. *1.* Rhombencéphale ; *2.* moelle ; *3.* ganglion rachidien ; *4.* sclérotome ; *5.* corde ; *6.* aorte ; *7.* arcs aortiques 3, 4, 6 ; *3.* thyroïde ;

9. oreillette ; *10.* foie ; *11.* poumon (bronche principale) ; *12.* cœlome (cavité pleuro-péritoniale) ; *13.* nerf trijumeau ; *14.* complexe acoustico-facial ; *15.* vésicule auditive ; *16.* arcs branchiaux 1, 2 ; *17.* sinus buccal ; *18.* amnios.

Fig. 143. — Fin du quatrième jour d'incubation. Section sagittale, imprégnation argentique. Mêmes indications que pour la figure précédente. *a*) Complexe spinal-vague ; *b*) nerf hypo glosse ; *c*) branche antérieure du nerf spinal.

Fig. 144. — Fin du quatrième jour d'incubation. Section sagittale. Imprégnation argentique. *1.* Nerf spinal ; *2.* racines apparentes de l'hypoglosse ; *3.* branches antérieures des nerfs rachidiens avec leurs ramifications tégumentaires ; *4.* somites ; *5.* rhombencéphale ; *6.* vésicule auditive ; *7.* veine cardinale antérieure.

Fig. 145 — Section transversale de la tête d'embryon de poulet au sixième jour d'incubation. Imprégnation argentique. *1.* Rhombencéphale ; *2.* prosencéphale ; *3.* œil ; *4.* vésicule auditive avec le canal endolymphatique ; *5.* ganglion de Gasser.

Fig. 146. — Section à travers l'embryon et les membranes extra-embryonnaires adjacentes au bout de 50 heures d'incubation. *a*) Corps de l'embryon ; *b*) amnios ; *c*) membrane séreuse ; *d*) endoderme vitellin avec les vaisseaux vitellins et ectoderme extra-embryonnaire (*e*).

Fig. 147. — Section transversale au niveau des membres inférieurs du corps de l'embryon de poulet le sixième jour d'incubation. Imprégnation argentique. *1.* Moelle ; *2.* ganglion rachidien ; *3.* somite ; *4.* corde ; *5.* aorte ; *6.* sympathique ; *7.* rameaux vers le plexus périaortique et la glande surrénale ; *8.* ébauche du métanéphros ; *9.* mésonéphros ; *10.* canal de Wolff ; *11.* mésentère ; *12.* intestin grêle ; *13.* ganglion mésentérique ; *14.* cœlome ; *15.* allantoïde (pédicule) ; *16.* artère ombilicale ; *17.* veine cardinale postérieure.

Fig. 148. — Embryon de poulet fixé le troisième jour d'incubation, après injection d'encre de Chine dans l'espace sous-embryonnaire, le deuxième jour d'incubation. Phagocytose de l'encre de Chine au niveau du cadre vitellin. Préparation totale.

Fig. 149. — Même explication que pour la figure 148. On remarque l'absence de la phagocytose dans l'aire transparente.

Fig. 150. — Section à travers l'embryon de poulet (de troisième jour d'incubation) et son aire vasculaire adjacente. Injection d'encre de Chine dans l'espace sous-embryonnaire. Phagocytose de l'encre de Chine par l'endoderme vitellin.

Fig. 151. — Détail de la figure 150. Injection d'encre de Chine dans l'espace sous-embryonnaire. Phagocytose de l'encre de Chine par l'endoderme vitellin. Adsorption de l'encre de Chine sur la surface des globules vitellins.

Fig. 152. — Injection d'encre de Chine dans l'espace sous-embryonnaire. *a*) Endoderme vitellin normal au bout de trois jours d'incubation. Préparation totale. Fixation : acide osmique. Conservation à la glycérine ; *b*) adsorption des granules d'encre de Chine, phagocytés par les cellules de l'endoderme vitellin, au niveau de la surface des globules vitellins. Préparation totale clarifiée à la glycérine ; *c*) mêmes détails qu'en *b*.

Fig. 153. — Plaque embryonnaire de truite (*Fario trutta*). Segmentation discoïdale. On remarque les rapports du disque segmenté avec le vitellus sous-jacent. Début de la formation de la cavité sous-germinale.

Fig. 154. — *a*, *b* et *c*) Segmentation de l'œuf de triton. Segmentation totale, inégale.

Fig. 155. — *a*) Blastomères de triton. Chaque blastomère possède sa « provision » de plaquettes vitellines. Clarification centrale = noyau ; *b*) section à travers le têtard, au début de la vie larvaire libre. Tube mésonéphrotique et cellules sanguines. Chaque cellule présente, à ce stade aussi, la provision de vitellus.

Fig. 156. — Têtard de triton. Musculature striée avec la provision de vitellus.

Fig. 157. — Têtard de grenouille au début de la vie larvaire libre. Les sections *a*, *b* et *c* démontrent le début de la consommation des dépôts de vitellus, au niveau du tube neural et de la musculature dorsale.

Fig. 158. — Section transversale par le tronc de l'embryon de poulet à 3 jours d'incubation. *1.* Cœlome intra- et *2.* extra-embryonnaire ; *3.* tube neural, *chorda* ; *4.* aorte ; *5.* endoderme ; *6.* ectoderme ; *7.* mésoderme avec somato- et viscéroplèvre ; *8.* somites ; *9.* corps de Wolff ; *10.* membrane vitelline ; vaisseaux vitellins ; *11.* plis amniotiques latéraux.

Fig. 159. — Ectoderme de la séreuse de Baer. Acide osmique, glycérine, contraste de phase, immersion. Les granules lipidiques forment des « couronnes » typiques périnucléaires.

Fig. 160. — Injection interstitielle d'encre de Chine diluée chez l'embryon de poulet de 4 jours. Macrophages qui ont phagocyté les granules d'encre de Chine. Cette dernière se trouve parmi les gouttes lipidiques, sous forme de conglomérats, d'ordinaire ronds.

Fig. 161. — *a*, *b* et *c*) Membrane chorio-allantoïdienne (au bout de 10 jours d'incubation). Phagocytose de l'encre de Chine par les macrophages. Glycérine, immersion, contraste de phase. Agglomérations rondes de granules d'encre de Chine, qui paraissent se trouver à l'intérieur de certaines vacuoles de digestion.

Fig. 162. — Endoderme de l'aire pellucide. Embryon de poulet de 4 jours. Acide osmique, glycérine. Couronnes périnucléaires de gouttes lipidiques.

Fig. 163. — Marge du cadre vitellin et aire pellucide adjacente, au bout de 4 jours d'incubation. Acide osmique, glycérine. Préparation totale. Cellules de l'endoderme vitellin, chargées de globules vitellins (à gauche et en bas). Les cellules de la zone pellucide possèdent les « couronnes » lipidiques périnucléaires.

Fig. 164. — *a*) Injection d'encre de Chine dans le canal épendymaire de l'embryon de poule à 4 jours d'incubation. Au bout de trois jours, seul le plafond mince du rhombencéphale a intensément phagocyté l'encre de Chine ; *b*) même détail qu'en *a*.

Fig. 165. — *a* et *b*) Macrophages de l'embryon de poulet de 10 jours. Coloration vitale transallantoïdienne au trypan bleu. On observe des granules de trypan bleu parmi les gouttes lipidiques.

Fig. 166. — Macrophages de l'embryon de poulet. *a*) Gouttes lipidiques ; *b*) image sur champ obscur.

Fig. 167. — Macrophage de l'embryon de poulet. Coloration vitale au bleu de Nil. Les gouttes lipidiques se sont colorées.

Fig. 168. — *a*) Tégument embryonnaire de pigeon, transplanté sur la membrane chorio allantoïdienne de l'embryon de poulet. Les lobules gras sont différenciés ; *b* et *c*) détails de ces lobules gras.

Fig. 169. — *a* et *b*) Epithélium amniotique de l'embryon de poulet. La disposition des granules d'encre de Chine phagocytés est similaire à celle des couronnes typiques de gouttes lipidiques.

Fig. 170. — Mélanoblaste d'origine Plymouth, 12 jours après la transplantation du tégument de Plymouth sur l'embryon de Leghorn. A côté, deux macrophages de Leghorn, qui ont phagocyté le pigment hétéroracial.

Fig. 171. — Mélanoblastes normaux, tégumentaires, de l'embryon de Plymouth, au bout de 9 jours d'incubation. A côté, des macrophages qui phagocytent des fragments détachés des ramifications des mélanoblastes. Mélanoblastes arrondis.

Fig. 172. — Phagocytose du propre pigment dans le tégument de l'embryon de Plymouth, au bout de 7 jours d'incubation.

Fig. 173. — Phagocytose du propre pigment dans le tégument de l'embryon de poulet de Plymouth, au bout de 13 jours d'incubation.

Fig. 174. — *a* et *b*) Mélanoblastes de l'embryon de Plymouth, au bout de 13 jours d'incubation ; *c*) macrophages dans le même tégument, avec le pigment phagocyté.

Fig. 175. — *a* et *b*) Macrophages dans le tégument embryonnaire de l'embryon de poulet de Plymouth à proximité des mélanoblastes. Pigment mélanique phagocyté dans des vacuoles de digestion (le septième jour d'incubation).

Fig. 176. — *a*) Tégument embryonnaire de la race de Plymouth (10 jours d'incubation) en culture de tissu. Milieu : plasma hépariné + extrait embryonnaire homoracial ; 48 heures après la mise en culture. Zone de croissance mésenchymateuse. Emigration de macrophages, en partie chargés de pigment mélanique phagocyté ; *b* et *c*) détails de *a*.

Fig. 177. — Culture de tissu du tégument embryonnaire de Plymouth. Macrophages émigrés, présentant du pigment mélanique phagocyté parmi les gouttes lipidiques. Membranes ondulantes.

Fig. 178. — *a* et *b*) Culture de tissu du tégument embryonnaire de Plymouth. Emigration de mélanoblastes dans la zone de croissance.

Fig. 179. — *a*) Culture de tégument embryonnaire de Plymouth. Macrophages à pigment mélanique phagocyté ; *b*) « rencontre » entre mélanoblastes et macrophages.

Fig. 180. — *a*, *b* et *c*) Culture de tégument embryonnaire de Leghorn, à 9 jours d'incubation ; 48 heures de culture. On ajoute de l'encre de Chine diluée à *b*. Phagocytose de l'encre de Chine par les fibroblastes.

Fig. 181. — *a*) Culture de membrane chorio-allantoïdienne de 11 jours + encre de Chine diluée dans le milieu de culture. Intense émigration de macrophages, qui ont phagocyté l'encre de Chine. Les macrophages sont en partie réunis par des prolongements protoplasmiques ; *b* et *c*) mêmes détails qu'en *a*.

Fig. 182. — Culture de tissu du tégument embryonnaire (Leghorn) + encre de Chine. Phagocytose de l'encre de Chine par les fibroblastes.

Fig. 183. — *a*) Fragment de chorio-allantoïde de Leghorn à 11 jours d'incubation, cultiveé dans du plasma hépariné pendant 18 heures. Lames épithéliales ; *b* et *c*) détails.

Fig. 184. — Lame épithéliale d'une culture de membrane chorio-allantoïdienne. Phagocytose de l'encre de Chine, introduite dans le milieu de culture, par les cellules épithéliales.

Fig. 185. — Culture de tégument embryonnaire de Leghorn ; on ajoute du kaolin et du pigment rétinien dans le mileu de culture. Phagocytose des fragments de kaolin et des bâtonnets de pigment rétinien, par les macrophages.

Fig. 186. — *a*) Pluristratification et transformation malpighienne de l'épithélium chorio-allantoïdien (excitant : sarcome de la Souris) ; *b*) on voit clairement des espaces intercellulaires, des ponts protoplasmiques.

Fig. 187. — *a*) Cornification de l'épithélium chorio-allantoïdien (excitant : tissu tuberculeux de Cobaye); *b*) pénétration de globes épithéliaux dans la profondeur de la membrane chorio-allantoïdienne (excitant : sarcome de la Souris) ; *c*) cornification de l'épithélium chorio-allantoïdien (vue *in situ* sur le vif ; excitant : rate de Souris).

Fig. 188. — *a*) Sarcome de la Souris blanche, transplanté sur la membrane chorio-allantoïdienne, le huitième jour d'incubation. Aspect (*in vivo*) le 15e jour d'incubation ; *b*) sarcome de la Souris blanche, transplanté sur la membrane chorio-allantoïdienne, le huitième jour d'incubation. Aspect de la partie inférieure du transplant, le 16e jour d'incubation. On voit la vascularisation de l'implant ; *c*) sarcome Rous, transplanté sur la membrane chorio-allantoïdienne, le huitième jour d'incubation. Aspect (*in vivo*) le 15e jour d'incubation.

Fig. 189. — *a*) Transplant de tissu sarcomateux (Souris blanche) sur la membrane chorio-allantoïdienne, avec formation de globes cornifiés ; *b*) image grossie ; *c*) transplant du tissu sarcomateux (Souris blanche) sur la membrane chorio-allantoïdienne. Nécrobiose de la partie superficielle de l'implant. Tissu tumoral vivant en contact avec les globes cornifiés de l'épithélium chorial. Transformation malpighienne autour de l'implant.

Fig. 190. — *a*) Transplant de tissu sarcomateux de Souris blanche sur la membrane chorio- allantoïdienne. Détails : globes cornifiés et prolifération infiltrative de l'épithélium vers la masse sarcomateuse ; *b*) des vaisseaux choriaux pénètrent, entre les globes cornifiés, dans le tissu tumoral implanté.

Fig. 191. — *a*) Sarcome Rous greffé sur le corps de l'embryon, le troisième jour d'incubation et fixé le 12e jour d'incubation ; *b* et *c*) détails de *a* ; *b*) forte réaction épithéliale ; *c*) réaction épithéliale.

Fig. 192. — Sarcome Rous cultivé sur la membrane chorio-allantoïdienne.

Fig. 193. — Sarcome de la Souris blanche, greffé sur le corps de l'embryon de poulet au troisième jour d'incubation. Fixation le 12e jour d'incubation. La tumeur infiltre la musculature de l'hôte, dont on ne constate aucune réaction.

Fig. 194. — Tubercules isolés sur la membrane chorio-allantoïdienne, 9 jours après l'infection avec une suspension de bacilles de Koch.

Fig. 195. — Violente réaction à nodules confluents de la membrane chorio-allantoïdienne. Infection par implant d'organe tuberculeux. Récolte 10 jours après l'infection.

Fig. 196. — Membrane chorio-allantoïdienne. Infiltration à un stade de début, 10 jours après l'infection par implant d'organe tuberculeux.

Fig. 197. — Membrane chorio allantoïdienne. Nodule plus développé, 10 jours après l'infection par implant d'organe tuberculeux.

Fig. 198. — Nodule massif, à zone centrale de nécrose sur la membrane chorio-allantoïdienne, 10 jours après l'infection par implant d'organe tuberculeux.

Fig. 199. — Membrane chorio-allantoïdienne, 10 jours après l'infection par implant d'organe tuberculeux. Symplastes à disposition radiaires autour d'une zone de nécrose.

Fig. 200. — Métaplasie de l'épithélium chorio-allantoïdien sous forme d'épaississements et de perles épithéliales, en partie cornifiées. 11 jours après l'infection par tissu embryonnaire baigné dans une suspension de bacilles.

Fig. 201. — Ilot épithélial (qui résulte de la prolifération de l'épithélium chorio-allantoïdien), 10 jours après l'infection par implant d'organe tuberculeux.

Fig. 202. — Embryon de poulet au bout de 15 jours d'incubation. Nodules paramédians, proéminants sous le tégument de la région dorsale développé après l'infection du corps embryonnaire (implant de tissu embryonnaire baigné dans une suspension de bacilles de Koch, introduit par myéloschizis ; 12 jours après l'infection).

Fig. 203. — Nodule de la figure 202, à un plus fort grossissement.

Fig. 204. — Section transversale, région dorsale, d'un embryon de poulet à 14 jours d'incubation. Nodule tuberculeux tégumentaire, 11 jours après l'infection du corps embryonnaire par implant de tissu baigné dans une suspension de bacilles.

Fig. 205 — Section transversale, région dorsale, de l'embryon de poulet à 17 jours d'incubation. Nodule tuberculeux à nécrose centrale, obtenu par infection directe du corps embryonnaire.

Fig. 206. — Nodule de la figure 205, à un plus fort grossissement.

Fig. 207. — Nodule tuberculeux à caséification centrale. Infection directe du corps embryonnaire par implant d'organe baigné dans une suspension de bacilles ; 10 jours après l'infection.

Fig. 208. — Infection directe du corps embryonnaire par implant de tissu baigné dans une suspension de bacilles, 13 jours après l'infection. Infiltrat inflammatoire spécifique, à l'endroit de l'implantation, dans le canal rachidien et dans le sac dural (méningite).

Fig. 209. — Infiltrat méningien de la figure 208.

Fig. 210. — Nodule inflammatoire sous-cutané, recouvert par l'épithélium tégumentaire. On remarque l'absence des réactions épithéliales et le développement normal des papilles des plumes embryonnaires. Infection directe du corps embryonnaire, par implant de tissu baigné dans une suspension de bacilles (l'aspect 11 jours après l'infection).

Fig. 211. — Nodules massifs, en partie caséifiés, sur la membrane chorio-allantoïdienne. Injection de suspension de bacilles dans le sac amniotique (l'aspect 15 jours après l'infection).

Fig. 212. — Schéma de l'action des forces de traction : *a*) longitudinale et *b*) transversale, sur le tube neural. Modèle : tube en caoutchouc incisé. L'incision tend à se fermer en *a*, devient béante en *b*.

Fig. 213. — Embryon de poulet à 9 jours d'incubation. Myéloschizis expérimental ; la plaque neurale ouverte (6 jours après l'intervention).

Fig. 214. — Embryon de poulet à 9 jours d'incubation. Le tube neural ouvert en deux endroits (6 jours après l'intervention).

Fig. 215. — Embryon de poulet à 18 jours d'incubation. Myéloschizis expérimental effectué le troisième jour d'incubation. Extériorisation de la moelle dorso-lombaire.

Fig. 216. — Myéloschizis, à 3 jours de l'opération (le 5e jour d'incubation). La plaque neurale déployée L'épendyme est continué par l'épithélium tégumentaire. Les ganglions rachidiens sont repoussés sous la plaque neurale. Les somites retroussés latéralement. Bande mésenchymateuse, entre la plaque neurale et le sclérotome. La partie dorsale du tronc est séparée de la partie antérolatérale par une gouttière, résultat du déploiement de la plaque neurale.

Fig. 217. — Embryon de la figure 216. Vue d'ensemble de la coupe.

Fig. 218. — *a*) Myéloschizis, à 3 jours de l'intervention. Région cervicale. Plaque neurale déployée. Bande mésenchymateuse entre la plaque et le sclérotome. Déformation des somites ; *b*) myéloschizis, à 3 jours de l'intervention. La plaque neurale commence à se détacher de son support. Phénomènes de démarcation de la plaque neurale.

Fig. 219. — Détail de la figure 218. Myéloschizis, 3 jours après l'opération. Profonde gouttière de délimitation de la partie dorsale du tronc.

Fig. 220. — Myéloschizis à 5 jours de l'intervention. Le tube neural est incomplètement ouvert.

Fig. 221. — Comparaison entre les rapports normaux du tube neural et les rapports topographiques avec les organes voisins en cas de myéloschizis expérimental. *a*) Myéloschizis expérimental. On remarque la bande mésenchymateuse qui sépare la plaque neurale du sclérotome ; *b*) témoin normal (imprégnation argentique).

Fig. 222. — Embryon de poulet. Début du troisième jour d'incubation. Section transversale par la partie médiane du tronc. Tube neural ; somites ; *chorda* ; canal de Wolff ; aorte ; ectoderme ; endoderme ; cœlome intra embryonnaire ; vaisseaux vitellins ; plis amniotiques latéraux ; membrane vitelline.

Fig. 223. — Embryon de poulet au début du troisième jour d'incubation. Section transversale par la partie caudale du tronc. Même légende que pour la figure 222.

Fig. 224. — *a*) Embryon de poulet. *Spina bifida* spontanée. Sympodie à position « axiale » des membres inférieurs ; *b*) le même cas ; dédoublement du canal épendymaire.

Fig. 225. — *a*) Vue d'ensemble de la section à travers la région affectée dans le cas de myéloschizis (*spina bifida*) spontanée chez l'embryon de poulet ; *b*) détails ; tronc nerveux anormal sur le plan médian et déformation du corps vertébral qui se rattache à ce tronc.

Fig. 226. — Embryon humain, au deuxième mois de grossesse, préparation fraîche, non fixée (*a* et *b*) ; en *c* et *d* l'embryon vu de dos : suture dorsale du tube neural et, en haut, rhombencéphale avec son plafond mince,

Fig. 227. — Nouveau-né avec *spina bifida* lombo-sacrée.

Fig. 228. — Nouveau-né. Craniorachischis. Anencéphalie. *a*) Vue dorsale et *b*) vue de face.

Fig. 229. — Schéma de l'opération de thermocoagulation de la moelle. Microcautère introduit dans le tube neural ouvert.

Fig. 230. — *a* et *b*) Embryon de 6 jours, 3 jours après la coagulation de la moelle au niveau des membres inférieurs. On remarque l'amoindrissement de la distance entre les membres supérieurs et les membres inférieurs (par flexion, lordose et contraction) ; à côté, le témoin normal.

Fig. 231. — *a* et *b*) Déformations qui s'installent après le 12e jour d'incubation, au niveau des membres inférieurs, chez les embryons opérés.

Fig. 232. — *a*) Embryon de 15 jours, auquel on a cautérisé la moelle au niveau des membres inférieurs. à l'âge de 3 jours. On constate l'installation d'une position vicieuse ,,en griffe''. Les membres présentaient aussi l'absence des mouvements normaux à cet âge ; *b*) embryon de 16 jours, auquel on a cautérisé la moelle au niveau des membres supérieurs. Les membres inférieurs, normalement développés, exécutaient les mouvements normaux pour cet âge.

Fig. 233. — *a*) Hémicautérisation de la moelle chez l'embryon de poulet ; *b* et *c*) neuroblastes le long du tronc néoformé.

Fig. 234. — Hémicautérisation de la moelle (après le myéloschizis).

Fig. 235. — *a*, *b* et *c*) L'hémocautérisation de la mœlle (après le myéloschizis) indique un tronc nerveux néoformé vers la moitié dépourvue de moelle.

Fig. 236. — *a*) Myéloschizis expérimental resté ouvert. Embryon de 20 jours à myéloschizis expérimental exécuté au troisième jour d'incubation. Destruction transversale de la moelle, par thermocautérisation, au

quatrième jour d'incubation. On voit les deux bouts de la moelle, entre lesquels un pont de communication s'est formé ; *b*) section longitudinale à travers le pont de communication chez un embryon de 7 jours.

Fig. 237. — Embryon de 7 jours, cautérisé au 3e jour. Section frontale-longitudinale à travers le tube neural. Le tube neural a été détruit sur une étendue d'environ 8 segments. On voit la partie régénérée du tube neural et le défaut médullaire restant (où le canal rachidien est demeuré vide). Un pont de communication s'est formé entre les deux extrémités médullaires sous la forme d'un faisceau de fibres nerveuses. Formation de multiples canaux épendymaires dans la partie régénérée (aspect tératoïde). Remarquer la riche vascularisation intra- et périmédullaire de la partie régénérée.

Fig. 238. — *a* et *b*) Détails de la figure 237. On voit le tronc de liaison, en section longitudinale, et les canaux épendymaires néoformés.

Fig. 239. — Détails de la figure 237. Aspect désorganisé de la moelle régénérée. Canaux épendymaires néoformés. Vaisseaux intramédullaires relativement grands.

Fig. 240. — *a*) Ablation totale de la moelle (opération au bout de trois jours d'incubation) au niveau des membres inférieurs. Rétablissement du tégument. Réaction intense de la phosphatase alcaline ; *b*) aspect normal des racines de l'arc vertébral. Au lieu de la moelle, un tissu mésenchymateux lâche et quelques vaisseaux.

Fig. 241. — Aspects de la moelle à la séconde période (au bout de 12 jours d'incubation).

Fig. 242. — *a*, *b*, *c*, *d* et *e*) Embryon à myéloschizis à proximité de la zone électrocoagulée ; un tronc nerveux se détache de la moelle ; et traverse le corps vertébral au niveau de la racine de l'arc ; *f*) détails. Le tronc nerveux, dans la lumière d'un canal qui traverse le modèle cartilagineux du corps vertébral.

Fig. 243. — Embryon de 7 jours ; destruction complète de la moelle au niveau des membres inférieurs, sur l'étendue de 10 segments. Section transversale. Défaut tégumentaire refermé ; absence de la mœlle. On remarque : le ganglion rachidien isolé, qui reçoit son tronc de fibres afférentes ; au lieu de la moelle, quelques troncs nerveux — en section transversale — qui se dirigent latéralement et complètent le nerf rachidien, en lui apportant son contingent moteur. Imprégnation argentique. *a*) Disposition typique de la racine antérieure. Régénération des racines antérieures, par formation d'une « queue de cheval » ; *b*) comparaison avec une section à travers un embryon normal ; c) deux ganglions rachidiens demeurés isolés.

Fig. 244. — Détail de la figure 243. On voit la racine antérieure régénérée.

Fig. 245. — *a* et *b*) Disposition topographique et ramification du nerf rachidien dans le cas de l'embryon de la figure 243. Absence du segment médullaire. Racine antérieure régénérée.

Fig. 246. — *a*) Disposition et épaisseur du nerf rachidien normal ; *b*) nerf rachidien de l'embryon opéré.

Fig. 247. — *a* et *b*) Plexus nerveux d'un membre appartenant à la région opérée.

Fig. 248, — *a*, *b* et *c*) Embryon de 6 jours, dont la moelle a été cautérisée au niveau des membres inférieurs à l'âge de 3 jours. Malformation des membres inférieurs, à aspect conique.

Fig. 249. — Embryon de 11 jours, dont la moelle a été cauté risée au niveau des membres supérieurs. Aspect conique du membre supérieur. *a*) Vue dorsale ; *b*) vue latérale ; *c*) détails.

Fig. 250. — *a* et *b*) Embryon de 10 jours, dont la mœlle a été cautérisée au bout de 3 jours, au niveau de membres inférieurs. La plaie tégumentaire complètement guérie. Un défaut s'est toutefois produit dans la paroi antéro-latérale droite, au niveau du corps de Wolff ; *c*) même embryon, vue latérale. Défaut de la paroi antéro-latérale du tronc, laissant apparaître le corps de Wolff. Les membres inférieurs, normalement développés.

Fig. 251. — Destruction totale de la moelle. Corde dorsale en apparence dédoublée et triplée au niveau de la région opérée [Plissement].

Fig. 252. — Embryon de 7 jours. Anencéphalie expérimentale. *a*, *b*) Electrocoagulation des vésicules cérébrales à 51 heures d'incubation. On a mis en évidence la phosphatase alcaline. La réaction de la phosphatase est d'intensité maximum au niveau du bulbe (*a*) et de la moelle (*b*). Embryon témoin (*c*) du même âge, chez lequel on a mis en évidence la phosphatase alcaline. La réaction de la phosphatase est faible au niveau de la moelle, négative au niveau du bulbe, maximum au niveau du diencéphale.

Fig. 253. — Embryon de poulet de 12 jours d'incubation. Ganglion rachidien. Différenciation des grandes cellules ganglionnaires. Imprégnation argentique.

Fig. 254. — *a* et *b*) Embryon de poulet de 12 jours d'incubation. Apparition du type ganglionnaire unipolaire.

Fig. 255. — *a*, *b* et *c*) Embryon de poulet de 12 jours d'incubation. Différenciation des grandes cellules ganglionnaires. Imprégnation argentique.

Fig. 256. — *a* et *b*) Embryon de poulet de 12 jours d'incubation. Terminaisons nerveuses motrices dans la musculature. Imprégnation argentique.

Fig. 257. — Section transversale par le cerveau « exencéphale » de l'embryon de poulet.

Fig. 258. — Embryon à exencéphalie spontanée à côté d'un témoin normal, du même âge (7 jours).

Fig. 259. — *a*) Embryon de poulet de 7 jours, dont le rhombencéphale a été ouvert au deuxième jour d'incubation. Vue *in situ* : on remarque l'ouverture au niveau du rhombencéphale, la conformation anormale du mésencéphale. La vésicule allantoïdienne ne s'est pas développée ; *b*) le même embryon extrait de l'œuf.

Fig. 260. — *a*) Embryon normal de poulet âgé de 7 jours. On remarque l'aspect bombé du mésencéphale ; *b*) embryon au plafond du rhombencéphale ouvert ; aspect « cérébroïde » des vésicules cérébrales.

Fig. 261. — *a*) Embryon normal de poulet âgé de 8 jours ; *b*) embryon du même âge, au rhombencéphale ouvert. Aspect anormal du mésencéphale, hémorragie ventriculaire dans le télencéphale.

Fig. 262. — *a*) Même embryon qu'à la figure 261 ; détails de la tête embryonnaire ; *b*) orifice du rhombencéphale.

Fig. 263. — Ouverture du rhombencéphale au bout de 48 heures d'incubation. Vue de la tête embryonnaire, le 12e jour d'incubation ; hernie cérébrale au niveau du rhombencéphale, rapprochement anormal des globes oculaires.

Fig. 264. — Embryon à rhombencéphale ouvert, aspect « cérébroïde » des vésicules cérébrales ; à côté, un embryon témoin normal, dont le mésencéphale a, au bout de 7 jours d'incubation, un aspect balonné.

Fig. 265. — *a* et *b*) Destruction par électro-thermocautérisation du pros- et mésencéphale, au bout de 45 heures d'incubation. « Embryon bulbaire » fixé après 9 jours d'incubation.

Fig. 266. — Le rectangle hachuré représente la région sur laquelle on a pratiqué l'intervention microchirurgicale.

Fig. 267. — Embryon bulbaire de la figure 265 mis en comparaison avec un témoin normal.

Fig. 268. — *a*, *b*, *c* et *d*) Embryon bulbaire fixé au bout de 16 jours d'incubation. Destruction par électrothermocautérisation du pros- et mésencéphale au bout de 45 heures d'incubation. Célosomie.

Fig. 269. — *a*) Embryon au bout de 17 jours d'incubation. Electrocoagulation après 50 heures d'incubation : hémidestruction partielle du pros et mésencéphale (droit) ; *b*) quatre formations kystiques (rudiments cérébraux) dans a région « vidée ». Configuration à « bec croisé ».

Fig. 270. — Embryon au bout de 17 jours d'incubation. Destruction partielle du télencéphale et du diencéphale au bout de 50 heures d'incubation. Hernie d'un rudiment cérébral. Absence bilatérale des globes oculaires.

Fig. 271. — *a* et *b*) « Bec croisé » obtenu par l'extraction du liquide amniotique.

Fig. 272. — Embryon au bout de 9 jours d'incubation. Absence du globe oculaire droit (électro-thermocoagulation au bout de 50 heures d'incubation). Absence du nerf optique et du tractus optique respectif. Asymétrie des cavités ventriculaires. Atrophie du diencéphale gauche.

Fig. 273. — Anencéphale spontané au bout de 7 jours d'incubation, comparativement à un témoin du même âge.

Fig. 274. — *a*, *b* et *c*) Embryon de poulet au bout de 6 jours d'incubation, avec malformation spontanée, exencéphalie à aspect «cérébroïde» de l'e céphale.

Fig. 275. — Télencéphale de l'embryon de poulet au bout de 8 jours d'incubation. Injection d'encre de Chine dans le plexus vasculaire périvésiculaire.

Fig. 276. — Embryon de poulet le huitième jours d'incubation. Injection intravasculaire d'encre de Chine. Vascularisation des vésicules cérébrales.

Fig. 277. — Section à travers la paroi du mésencéphale. Le plexus vasculaire périvésiculaire présente des érythrocytes.

Fig. 278. — Tégument de l'embryon de poulet de Leghorn au bout de 8 jours d'incubation (région dorsale). Formation des papilles dermiques.

Fig. 279. — Tégument de l'embryon de poulet au bout de 9 jours d'incubation. Section à travers l'ébauche du duvet embryonnaire. Composant épitélial, composant conjonctivo-vasculaire.

Fig. 280. — Tégument dorsal de l'embryon de Leghorn au bout de 12 jours d'incubation. Injection d'encre de Chine dans les capillaires.

Fig. 281. — Membre supérieur de l'embryon de poulet au bout de 12 jours d'incubation. Injection d'encre de Chine dans les capillaires.

Fig. 282. — Tégument dorsal de l'embryon de poulet au bout de 13 jours d'incubation. Injection d'encre de Chine dans les capillaires.

Fig. 283. — *a*) Tégument de l'embryon de poulet, au bout de 12 jours d'incubation. Injection d'encre de Chine dans les capillaires ; *b*) même tégument, autre région.

Fig. 284. — *a*) Tégument de l'embryon de poulet, au bout de 12 jours d'incubation. Membre supérieur. Injection totale des vaisseaux à l'encre de Chine ; *b*) autres détails de la même préparation.

Fig. 285. — *a, b* et *c*) Embryon de poulet au bout de 12 jours d'incubation. Tégument. Imprégnation argentique. Innervation de la papille. Le minuscule tronc nerveux pénètre près du vaisseau sanguin dans l'axe conjonctivo-vasculaire de la papille ; *b* et *c*) plexus nerveux dermique et innervation des papilles.

Fig. 286. — Tégument de l'embryon de Plymouth au bout de 9 jours d'incubation. Intense multiplication des mélanoblastes à l'intérieur des papilles du duvet.

Fig. 287. — Schéma de l'implant de tégument hétérostadial, ontogénétiquement avancé. Les papilles de l'hôte, moins avancées, ne sont pas stimulées par un tel implant.

Fig. 288. — Embryon de Leghorn au bout de 6 jours d'incubation. Implant de tégument de Plymouth ayant une avance ontogénétique de 5 jours.

Fig. 289. — Embryon de Leghorn de 7 jours, avec implant de Plymouth.

Fig. 290. — Embryon de Leghorn au bout de 8 jours d'incubation. Implant de Plymouth ayant une avance ontogénétique de 5 jours. Diffusion des mélanoblastes dans l'hôte.

Fig. 291. — Tégument hybride de l'embryon de la figure 290.

Fig. 292. — Embryon de Leghorn de 11 jours, avec implant de Plymouth. Zone de diffusion des mélanoblastes dans l'hôte.

Fig. 293. — Embryon de Plymouth, au bout de 8 jours d'incubation. Implant de tégument de Leghorn avec une avance ontogénétique de 5 jours, devenu noir par suite de l'intense multiplication des mélanoblastes de l'hôte.

Fig. 294. — *a* et *b*) Sections transversales de la papille de Leghorn. Les promélanobla tes sont mis en évidence par l'imprégnation argentique. Ils sont disposés typiquement à la base des crêtes épithéliales ; *c*) section transversale d'une papille de Plymouth. Disposition normale des mélanoblastes.

Fig. 295. — Schéma de la culture « dans l'œuf » du tégument embryonnaire. *a*) Enlèvement de la plaque embryonnaire ; *b*) remplacement de la plaque embryonnaire par le tégument embryonnaire ; *c*) retransplantation du tégument cultivé dans l'œuf, sur l'embryon de poulet.

Fig. 296. — *a*) Implant de tégument de pigeon (race pigmentée) sur l'hôte de Leghorn. L'implant se développe sans pigmentation : « explosion de pigment » dans le tégument de l'hôte ; mélanisation des promélanoblastes diffusés ; *b*) détails indiqués au point *a*.

Fig. 297. — Schéma de l'implant receveur de mélanoblastes. Receveur : tégument de Leghorn. Donneur : tégument de Plymouth.

Fig. 298. — Schéma de l'implant diffuseur de mélanoblastes. Receveur : Leghorn. Diffuseur : tégument de Plymouth.

Fig. 299. — Schéma de l'implant diffuseur de promélanoblastes. Diffuseur : tégument de pigeon. Receveur : tégument de Leghorn.

Fig. 300. — Schéma de l'implant non récepteur de mélanoblastes. Diffuseur : tégument de Plymouth. Non récepteur : tégument de pigeon.

Fig. 301. — Transplantation de tégument de Plymouth sur pigeon. Absence de diffusion des mélanoblastes sur l'hôte.

Fig. 302. — *a* et *b*) Détails indiqués à la figure 301.

Fig. 303. — Implant de tégument de perroquet (*Melopsitacus ondulatus*) sur l'hôte de Leghorn.

Fig. 304. — Aspect des mélanoblastes de perroquet immigrés dans le duvet de l'embryon de Leghorn.

Fig. 305. — Aspect des mélanoblastes de Plymouth immigrés dans le duvet de l'embryon de Leghorn.

Fig. 306. — Schéma de la culture du tégument embryonnaire sur la membrane chorio-allantoïdienne, non innervée, mais irriguée par l'embryon.

Fig. 307. — Schéma de la culture affrontée : Leghorn — Plymouth sur la chorio-allantoïde de l'embryon de Leghorn. Diffusion des mélanoblastes du tégument de Plymouth dans le tégument de Leghorn.

Fig. 308. — Schéma de la culture affrontée : Leghorn — pigeon, sur la chorio-allantoïde de l'embryon de Leghorn Absence, dans ces conditions, de la mélanisation des promélanoblastes de pigeon.

Fig. 309. — Culture affrontée : Leghorn — Plymouth, sur la membrane chorio-allantoïdienne de l'embryon de Leghorn. Diffusion des mélanoblastes.

Fig. 310. — Culture affrontée : Leghorn — pigeon, sur la membrane chorio-allantoïdienne de l'embryon de Leghorn. Absence, dans ces conditions, de la mélanisation des promélanoblastes de pigeon.

Fig. 311. — *a* et *b*) Culture de tissu (plasma hépariné) de tégument embryonnaire de pigeon de Leghorn. Formation d'un pont de communication mixte. Absence de l'apparition des mélanoblastes de pigeon.

Fig. 312. — *a* et *b*) Culture de tissu du tégument embryonnaire de Plymouth. Immigration et multiplication des mélanoblastes dans la zone de croissance.

Fig. 313. — Embryons de poulet de race Leghorn (*a* et *c*) auxquels on a implanté, le troisième jour d'incubation, des greffes de tégument embryonnaire de pigeon, race pigmentée, de 6 jours. En (*b*), un embryon de pigeon, race pigmentée, le 15e jour d'incubation, dont le frère a été utilisé comme donneur de tégument pour ces greffes. On constate autour du greffon, dans le tégument de l'hôte, une zone intensément pigmentée par l'émigration des promélanoblastes des papilles de l'implant, qui demeurent non pigmentées ou très faiblement pigmentées. Le tégument de l'embryon de pigeon, employé en tant que témoin, indique la croissance et la différenciation des papilles des plumes et l'absence de pigment pendant le développement embryonnaire (le pigment n'apparaît, macroscopiquement que quelques semaines après l'éclosion).

Fig. 314. — Embryon au bout de 6 jours d'incubation. *a*) Mésonéphros. Matériel frais examiné à la loupe binoculaire. Trypan bleu ; les teintes foncées repré entent la concentration du colorant ; *b*) tubes mésonéphrotiques.

Fig. 315. — Même explication que pour la figure 314. *a*) Ob. 3, oc. 6 ; *b*) ob. 7, oc. 6.

Fig. 316. — *a*) Embryon de 7 jours. Trypan bleu. Examen à la loupe. Le mésonéphros chargé de colorant ; *b*) section à travers un embryon, au bout de 8 jours d'incubation ; la réaction de la phosphatase alcaline est positive au niveau des tubes mésonéphrot ques.

Fig. 317. — Section à travers un tube contourné mésonéphrotique, à granules de trypan bleu. Ob. à immersion, oc. 6.

Fig. 318. — Section à travers les tubes mésonéphrotiques d'un embryon de 12 jours ; granules de trypan bleu seulement dans les tubes contournés. Ob. à immersion, oc. 5.

Fig. 319. — Aspects de dégénérescence des tubes contournés du mésonéphros d'un embryon de 15 jours. Ob. à immersion, oc. 5.

Fig. 320. — Double coloration des néphrons au trypan bleu. Les parties colorées en bleu ressortent sur la figure en une teinte foncée ; les parties colorées en violet, en teintes plus claires.

Fig. 321. — Métanéphros. Embryon de 17 jours. Matériel frais examiné à la loupe binoculaire. Trypan bleu. *a*) Photographie ; *b*) dessin.

Fig. 322. — Embryon de 7 jours. Cristaux sphériques d'acide urique dans la lumière d'un tube collecteur. Coloration rouge neutre. *a*) Ob. 3, oc. 5 ; *b*) ob. à immersion, oc. 5.

Fig. 323. — Agglomérations massives de cristaux sphériques d'acide urique dans le mésonéphros de l'embryon de 16 jours. Ob. loupe, oc. 5.

Fig. 324. — Un aspect de la préparation précédente. Ob. 7.

Fig. 325. — *a* et *b*) Cristaux sphériques colorés au rouge neutre.

Fig. 326. — Disposition des cristaux d'acide urique dans le métanéphros.

Fig. 327. — Elimination de l'indigo-carmin (mésonéphros).

Fig. 328. — Fluorescence du mésonéphros d'un embryon de 6 jours.

Fig. 329. — Fluorescence du mésonéphros d'un embryon âgé de 7 jours.

Fig. 330. — Embryon de 13 jours. Fluorescence du mésonéphros (à droite), légère fluorescence du métanéphros (à gauche).

Fig. 331. — Embryon au bout de 14 jours d'incubation. Fluorescence du méso- et du métanéphros.

Fig. 332. — Embryon au bout de 15 jours d'incubation. Fluorescence du méso- et du métanéphros. Le foie et les glandes fluorescents.

Fig. 333. — Réaction de la phosphatase alcaline au niveau du mésonéphros de l'embryon de 5 jours.

Fig. 334. — Réaction de la phosphatase alcaline au niveau du métanéphros de l'embryon de 11 jours. Ob. loupe.

Fig. 335. — Aspects comparatifs des glomérules du mésonéphros (*a*) et métanéphros (*b*) chez l'embryon de 17 jours.

Fig. 336. — Muqueuse gastrique de l'embryon de poulet, au bout de 12 jours d'incubation. Le phénomène de sécrétion mérocrine.

Fig. 337. — Mélange de la sécrétion mérocrine avec le contenu gastrique, dans l'estomac musculaire de l'embryon de poulet de 12 jours.

Fig. 338. — Epithélium de la muqueuse gastrique au bout de 10 jours d'incubation. De fines gouttes de sécrétion apparaissent au niveau du sommet des cellules.

Fig. 339. — Muqueuse gastrique de l'embryon de poulet au bout de 12 jours d'incubation. Pendant la mitose(les noyaux avancent vers l'apex des cellules.

Fig. 340. — *a* et *b*) Phénomènes de sécrétion des épithéliums pulmonaires chez l'embryon de poulet, au bout de 7 jours d'incubation.

Fig. 341. — Embryon de poulet. Début du sixième jour d'incubation. Le tronc artériel (« aorte ventrale », avec les arcs artériels branchiaux III, IV et VI.

Reconstruction plastique. *BC* = *bulbus cordis* ; *AO* = aorte dorsale ; *Tr. a* = tronc artériel ; *Tr. el. pr. b.* = extrémité inférieure du tractus élastique primitif ; *Tr. el. pr. a.* = extrémité supérieure du tractus élastique primitif.

Fig. 342. — Embryon de poulet. Début du quatrième jour d'incubation. Section à travers le tronc artériel (*T*) ; tractus élastique primitif (↓). *VI* = arc artériel VI. La section correspond au niveau de l'extrémité inférieure du tractus élastique primitif de la figure 341.

Fig. 343. — Embryon de poulet. Fin du quatrième jour d'incubation. Reconstruction du cœur, des arcs branchiaux vasculaires et de l'aorte. Le tractus élastique primitif (*tr. el. pr. a.* et *b.*) est indiqué par la nuance foncée ; A_l = oreillette ; *SV* = *sinus venosus* ; *V. c. i.* = veine cave inférieure ; *V* = ventricule. *El. par.* = tissu élastique pariétal ; *PE* = coussinet endocardique ; *B. C.* = *bulbus cordis*.

Fig. 344. — Reconstruction plastique. Même légende que pour la figure 343.

Fig. 345. — Section transversale d'un embryon de poulet, vers la fin du quatrième jour d'incubation. *A* = aorte dorsale ; *V.C.* = veines cardinales ; *ol* = oreillette ; *B* = *bulbus cordis* ; *V* = ventricule — région du tractus élastique primitif dans le « médiastin » embryonnaire.

Fig. 346. — *a*) Embryon de poulet, au cinquième jour d'incubation. Section transversale par le septum aorto-pulmonaire (*S*) ; *P* = artère pulmonaire ; *A* = aorte. La masse granulaire à coloration foncée = tractus élastique primitif ; *b*) détails.

Fig. 347. — Les granules « élastiques » du tractus élastique primitif.

Fig. 348. — Embryon de poulet à 5 jours d'incubation. *a*) Tractus élastique primitif. Disposition des granules « élastiques » en rangées ayant l'aspect de chaînes de « streptocoques » ; *b*) mise en évidence de la fibrille non colorée, à l'intérieur de laquelle se produit la différenciation des granules.

Fig. 349. — Embryon de poulet, à 7 jours d'incubation. Section transversale par le bulbe du cœur. *A* = aorte ; *P* = artère pulmonaire ; (↓) = tractus élastique granulo-filamenteux septal. Apparition des fibres élastiques pariétales.

Fig. 350. — Section à travers le bulbe du cœur de la figure 319, à un niveau plus distal. (↓) = Tractus élastique. *A* = aorte, *P* = artère pulmonaire.

Fig. 351. — Embryon de poulet à 11 jours d'incubation. Rudiment (*rest.* IV) élastique de l'arc vasculaire IV gauche (transformé en ligament élastique). *A* = aorte.

Fig. 352. — *a* et *b*) Embryon de poulet au sixième jour d'incubation. Reconstruction du cœur et des grands vaisseaux. *A.S.* = oreillette gauche ; *V.S.* = ventricule gauche ; *A.D.* = oreillette droite ; *V.D.* = ventricule droit ; *P.D.* = pulmonaire droite ; *P.S.* = pulmonaire gauche ; *AO* = aorte ; *E.par.* = tissu élastique pariétal ; *Rest. tr. el. pr.* = reste du tractus élastique primitif ; *Tl. sept.* = tissu élastique septal.

Fig. 353. — Portion de la reconstruction de la figure 352 (même légende que pour la figure 352).

Fig. 354. — Schéma du tronc artériel partiellement divisé par un septum. Disposition des éléments élastiques pariétaux (*par.*), par rapport au tractus élastique septal (↓).

Fig. 355. — Fibres élastiques (homme adulte) ; mise en évidence des discontinuités.

Fig. 356. — Embryon humain avec ses annexes, deuxième mois ; (↓) = sac vitellin.

Fig. 357. — Embryon de poulet à 7 jours d'incubation. Sac vitellin. Formation du « pli vitellin ». Les deux versants formés par l'endoderme vitellin se sont rejoints. Le pli contient l'artère vitelline, avec les capillaires hématopoïétiques adjacents, pleins d'éléments sanguins jeunes. Les vacuoles de l'endoderme vitellin sont vides (dissolution des lipides pendant la préparation en vue de l'inclusion à la paraffine).

Fig. 358. — Détails de la figure 357. A l'intérieur de l'artère, des érythrocytes circulants. Foyers hématopoïétiques juxta-artériels, pleins d'éléments sanguins jeunes.

Fig. 359. — Sac vitellin ; 13 jours d'incubation. Injection totale d'encre de Chine ; réseau superficiel et veines collectrices. Apparition brusque, des profondeurs, de troncs de communication.

Fig. 360. — Surface du sac vitellin à 13 jours d'incubation. Injection d'encre de Chine. Veines vitellines, réseau de capillaires superficiels et vaisseaux de liaison qui surgissent des profondeurs (des plis de la membrane vitelline immergée dans la masse du vitellus) ; on voit les lignes d'immersion.

Fig. 361. — Paroi du sac vitellin à 12 jours d'incubation. Injection totale d'encre de Chine. Réaction à la benzidine, préparation totale, clarification dans de la glycérine. Dessin à la chambre claire. *A* = artère vitelline avec les foyers hématopoïétiques adjacents. Relations de ces derniers avec les vaisseaux capillaires de liaison, qui se jettent dans les veines superficielles ; *V* = veines collectrices du sac vitellin

Fig. 362. — Section à travers un pli vitellin à 13 jours d'incubation. Hématoxyline - éosine. Ob. 7, oc. 15. Dessin à la chambre claire. *a*) Lumière de l'artère, entourée de foyers de leucocytes éosinophiles (myélocytiformes). Trois capillaires hématopoïétiques dilatés.

Fig. 363. — Pli vitellin. Section longitudinale à travers une artère vitelline (elle contient des hématies différenciées) (↑). Disposition juxta artérielle des foyers hématopoïétiques formant des « appendices moniliformes ».

Fig. 364. — Pli vitellin au bout de 17 jours d'incubation. Préparation totale. Réaction à la benzidine. Appendice moniliforme, « épines », juxta-artérielles.

Fig. 365. — Sac vitellin à 15 jours d'incubation. *V* = veines vitellines ; *A* = artère vitelline dans le pli hématopoïétique.

Fig. 366. — Pli vitellin au bout de 15 jours d'incubation. Artère vitelline à nodosités hématopoïétiques. Elle se trouve au centre d'un réseau spatial de capillaires.

Fig. 367. — Sac vitellin, embryon de 13 jours ; injection d'encre de Chine. Section perpendiculaire à la surface du sac (image à la loupe). On peut voir : le réseau vasculaire superficiel, les plis vitellins (*AA*), avec les artères vitellines «immergées », entourées de foyers hématopoïétiques et de l'endoderme vitellin (blanchâtre).

Fig. 368. — *a* et *b*) Sac vitellin. Vue d'ensemble. Disposition des plis vitellins hématopoïétiques.

Fig. 369. — Aire vasculaire développée après l'interruption de la communication avec le cœur, le deuxième jour d'incubation. Aspect au sixième jour d'incubation. Réaction de la benzidine.

Fig. 370. — Aire vasculaire dépourvue de circulation, le cinquième jour d'incubation. On voit les culs-de-sac.

Fig. 371. — Aire vasculaire dépourvue de circulation, au bout de 6 jours d'incubation (embryon détruit au deuxième jour d'incubation). Zones concentriques plexiformes de vaisseaux sinusoïdes. Kyste hématique central.

Fig. 372. — Aire vasculaire dépourvue de circulation, à 6 jours d'incubation. Configuration générale.

Fig. 373. — Formation de l'aire vasculaire deux jours après l'excision de l'embryon, effectuée le premier jour d'incubation. L'aire s'est développée de manière excentrique.

Fig. 374. — Aire vasculaire dépourvue de circulation, vitellus, endoderme vitellin avec globules vitellins intracellulaires et un vaisseau contenant des érythrocytes différenciés, à 7 jours d'incubation. Les plis vitellins d'« immersion » ne se sont pas formés.

Fig. 375. — Détail de la figure 374. Le vaisseau à érythrocytes différenciés ; les cellules de l'endoderme vitellin avec des globules vitellins intracellulaires.

Fig. 376. — Sections à travers le blastoderme de l'embryon, au bout de 24 heures d'incubation. Images en contraste de phase. *a* = Ectoderme ; *M* = mésoderme, avec des îlots sanguins (Wolff et Pander) ; *E.V.* = endoderme vitellin avec des globules vitellins et des « syngranules » (selon la dénomination d'O.B. Lépéchinskaïa) ; *b* = îlot sanguin à l'intérieur du mésoderme (*M*) ; *E.V.* = endoderme vitellin à la phase de syncytium, contenant des globules vitellins. On constate un « syngranule » dans le voisinage de l'îlot sanguin (↓).

Fig. 377. — Embryon de poulet. Section à travers l'aire vasculaire à 24 heures d'incubation. *a*) *M* = Mésoderme avec des îlots sanguins (Wolff-Pander) ; *E.V.* = endoderme vitellin ;(↑) = limite de l'aire opaque, rempart vitellin. On remarque un îlot sanguin en plein endoderme ; *b*) deux îlots sanguins en plein endoderme vitellin syncytial, à côté d'un « syngranule », prêt à pénétrer dans le mésoderme. Au-dessus, le mésoderme à tissu hématopoïétique ; *c*) détail.

Fig. 378. — Embryon de poulet. Section à travers la plaque embryonnaire à 24 heures d'incubation. *a*) On voit au milieu l'aire embryonnaire à la gouttière primitive, l'ecto-, le méso- et l'endoderme. On remarque latéralement l'aire pellucide ; (↓), limite de l'aire opaque ; *b*) partie gauche de la préparation de *a* ; un « syngranule » vitellin a pénétré dans un îlot sanguin.

Fig. 379. — *a*) Détail de la figure 378 ; *b*) image vue à plus fort grossissement ; *M* = mésoderme avec des îlots sanguins de type Wolff-Pander ; *E.V.* = endoderme dans la phase syncytiale. Formation de « syngranules » ; *S* = syngranule à l'intérieur de l'îlot sanguin ; *c*) autre aspect de la même série ; syngranule situé entre le méso- et l'endoderme.

Fig. 380. — Embryon au bout de 30 heures d'incubation. On remarque des éléments vitellins intensément colorés. Coloration vitale au bleu de Nil.

Fig. 381. — Détail de la figure 380. On voit des éléments vitellins en état de fragmentation (syngranules).

Fig. 382. — *a* et *b*) Aires vasculaires sans circulation chez un embryon de 4 jours. Conservation du corps embryonnaire.

Fig. 383. — *a* et *b*) On remarque, chez les embryons de la figure 382, l'allongement transversal des somites, a continuation de leur différenciation dans la direction caudale et la fragmentation de quelques somites (↓), ainsi que le développement de l'amnios.

Fig. 384. — Schéma de la préparation de l'œuf pour l'irradiation.

Fig. 385. — Embryon de poulet au bout de 2 jours d'incubation, irradié après 36 heures. Réaction à la benzidine (12 heures après l'irradiation). La moitié irradiée de l'aire vasculaire est arriérée au point de vue du développement. *a*) Embryon normal de contrôle ; *b*) embryon irradié.

Fig. 386. — Irradiation du secteur externe de la moitié gauche de l'aire vasculaire, à 48 heures d'incubation. Aspect de l'aire vasculaire au bout de 72 heures d'incubation. Le secteur irradié est nécrotique, linéairement délimité. La réorganisation du réseau vasculaire a commencé.

Fig. 387. — Irradiation de la moitié droite de l'aire vasculaire, au bout de 48 heures d'incubation. Aspect de l'aire vasculaire à 48 heures après l'irradiation. Disparition presque complète de la moitié irradiée de l'aire vasculaire. Position excentrique de l'embryon ; sinus marginal néoformé du côté droit.

Fig. 388. — Section à travers la partie non irradiée de l'aire vasculaire, au bout de 72 heures d'incubation. Vaisseaux vitellins normaux, à érythrocytes.

Fig. 389. — Section à travers la zone de l'aire vasculaire adjacente à la zone irradiée. Le même embryon que celui de la figure 388. On remarque la présence des îlots sanguins compacts (de type Wolff-Pander). Il n'y a pas de vaisseaux sanguins.

Fig. 390. — Détail grossi de la figure 389. *a*) Absence des mitoses dans les cellules de l'îlot. Endoderme vitellin avec des globules de vitellus. Image en contraste de phase ; *b*) les noyaux de l'endoderme vitellin.

Fig. 391. — Détail grossi de la figure 389. Les cellules de l'îlot sanguin, les noyaux de l'endoderme vitellin. Aspect des sphérules vitellines des cellules de l'endoderme. Immersion. Contraste de phase.

Fig. 392. — Chorio-allantoïde de l'embryon de 9 jours. Injection totale d'encre de Chine dans les vaisseaux. *a*) Vue générale de l'allantoïde étendue sur le réseau vitellin ; *b*) détail grossi. La tache représente l'extravasion formée à l'endroit de l'injection.

Fig. 393. — *a* et *b*) Injection d'encre de Chine chez l'embryon de 9 jours. Ramification typique des artères et des veines.

Fig. 394. — *a* et *b*) Injection d'encre de Chine. Allantoïde d'embryon à 9 jours d'incubation. Les artères sont colorées en noir, les veines ont une teinte plus claire. Mise en évidence des capillaires respiratoires.

Fig. 395. — Embryon au bout de 9 jours d'incubation. Injection d'encre de Chine. Le « lobule » avec les vaisseaux afférents et efférents. Capillaires respiratoires.

Fig. 396. — *a* et *b*) Chorio-allantoïde de l'embryon de 9 jours. Injection d'encre de Chine. Capillaires respiratoires. Préparation totale. Clarification dans la glycérine.

Fig. 397. — *a* et *b*) Chorio-allantoïde de l'embryon au bout de 12 jours d'incubation. Rapport entre l'épithélium et les capillaires respiratoires.

Fig. 398. — *a* et *b*) Injection d'encre de Chine dans la chorio-allantoïde de l'embryon de 14 jours. Développement complet de la structure fonctionnelle optimum du réseau vasculaire.

Fig. 399. — Variations du blanc et du jaune d'œuf, conjointement avec celles du liquide sous-embryonnaire.

Fig. 400. — Formation du liquide sous-embryonnaire

Fig. 401. — Variations du blanc et du jaune d'œuf. Méthode du bouillage.

Fig. 402. — Variations du pH.

Fig. 403. — Variations des lipides dans le liquide sous-embryonnaire (extrait alcool éthérique).

Fig. 404. — Glucose dans le liquide sous-embryonnaire.

Fig. 405. — Protéines dans le liquide sous-embryonnaire.

Fig. 406. — *a* et *b*) Technique de l'injection intra-allantoïdienne de vitellus liquéfié. Œuf au bout de 5 jours d'incubation, largement ouvert pour la démonstration. On voit le sac allantoïdien injecté. Il couvre partiellement le corps embryonnaire, vers lequel convergent les vaisseaux vitellins. Le sac vitellin a été ouvert (en↓). Il est possible à ce moment d'aspirer par cet orifice environ 15 ml de vitellus liquéfié.

Fig. 407. — *a*, *b*, *c* et *d*) Par le semi-séchage du vitellus liquéfié, on obtient ces cristaux, parmi lesquels se trouvent des globules de vitellus.

Fig. 408. — Poussin de Leghorn à l'éclosion. On lui a injecté, le cinquième jour d'incubation, 2 ml de liquide vitellin dans le sac allantoïdien. Poids à l'éclosion, 43 g. A côté du poussin, la coquille calcaire de l'œuf et la fenêtre pratiquée pour l'injection.

Fig. 409. — Poussin de la figure 408, près d'un témoin, une semaine après l'éclosion.

Fig. 410. — Autre position du poussin de la figure 408, près du témoin.

Fig. 411. — Rapport normal entre le poids de l'œuf avant l'incubation, son poids à la fin de l'incubation et le poids du poussin fraîchement éclos, ce dernier étant en moyenne égal au poids de l'œuf avant l'incubation, moins 20 g.

Fig. 412. — Courbes de croissance normale (témoins) pour les animaux de printemps. Les coqs atteignent 2 000—2 500 g et les poules 1 500 g, à l'âge de 7 mois.

Fig. 413. — Courbes de croissance chez des poules normales, ponte d'été. Le poids des poules âgées de 7 mois varie entre 1 120 et 1 450 g.

Fig. 414. — Courbes de croissance d'un couple de la génération parentale expérimentale.

Fig. 415. — *a*, *b*, *c* et *d*) Poids des œufs et des poussins correspondants F_1, obtenus des poules de la génération parentale. On remarque, notamment chez la poule n° 54, les surpoids spontanés.

Fig. 416. — Courbes de croissance du lot de printenps F_1 (les courbes pointillées indiquent les témoins) ; le coq a atteint 3 kilos à 6 mois.

Fig. 417. — Courbes de croissance du lot d'été de la génération F_1 (hachures verticales) comparativement au lot de témoins (hachures horizontales). Les maximums du lot de témoins se superposent en partie (le troisième jusqu'au sixième mois) à la zone de la largeur de variabilité du lot expérimental. Le lot expérimental comprend 18 poules, le lot témoin inclut 7 poules. A remarquer la largeur restreinte de la variabilité du lot expérimental.

Fig. 418. — Poids des œufs avant l'incubation et poids des poussins respectifs, fraîchement éclos, de la génération F_2 (1953). Excepté quatre cas, tous les poussins présentent spontanément à l'éclosion des surpoids.

Fig. 419. — Poussins de la génération F_2 par comparaison aux poussins témoins.

Fig. 420. — Les coqs A, B, C (éclos le même jour), à l'âge de deux mois. A = descendant F_1 de la génération parentale injectée ; B = témoin non traité ; C = provient d'un œuf lourd, non injecté.

Fig. 421. — Mêmes oiseaux que ceux de la figure 420, à l'âge de 7 mois.

Fig. 422. — Autre image, à 7 mois.

Fig. 423. — Génération F_2, à côté d'un témoin normal.

Fig. 424, 425, 426 et 427. — Autres oiseaux du même lot que ceux de la figure 423.

Fig. 428. — Tableau synoptique des valeurs moyennes exprimant les poids des œufs, des poussins du premier jour et de ceux qui atteignent le seuil adulte, de 7 mois, provenant des générations expérimentales P, F_1 et F_2 On remarque le caractère progressif des poids moyens.

Fig. 429. — *a* et *b*) Expérience de contrôle, 1953. Œufs, ayant le même poids, provenant du lot expérimental F_1 et des témoins. On constate la nette différence des poids des poussins fraîchement éclos, appartenant à ces deux lots. Les poussins du lot expérimental présentent des surpoids spontanés, les poussins témoins présentent des poids normaux ou sous-normaux.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ЧАСТЬ II

ЧАСТЬ III

ЧАСТЬ IV

ЧАСТЬ V

SOMMAIRE

CINQUIÈME PARTIE

Dat la cules 17.09.1957. Bun de tipar 10.02.1958. Tiraj 1600 ex. Hîrtie velină ilustrații de 80 g.m² și 600 ex. pe hîrtie cretată de 100 g.m² numerotate de la 1 la 600. Format 8/61 × 86. Coli editoriale 45,7 Coli de tipar 101 + 3 planșe pliante tipo. A. 1188/1957.
Indicele de clasificare pentru biblioteci mari: 611 -- 013,9.
Indicele de clasificare pentru biblioteci mici: 611.

Tiparul executat sub comanda nr. 1778 la Întreprinderea poligrafică nr. 3.
Bulevardul 6 Martie nr. 29, București, R.P.R.

E R A T Ă

Pag.	rîndul	în loc de :	se va citi :
177	Legenda fig. 111 rîndul 3 şi 4	atriu; 5 — ventricul; 6 — bulb; 7 — arcurile bronhiale arteriale; 8 — aorta dorsală; + vena cardinală posterioară; 9 — vase viteline, 10 —	5 — atriu; 6 — ventricul; 7 — bulb; 8 — arcurile branhiale arteriale; 9 — aorta dorsală + vena cardinală posterioară; 10 — vase viteline;
238	4 de jos	hipo-	hiper-
629	Explicaţia fig. 365	25 zile	15 zile
638	15 de sus	de diferenţiere	de dediferenţiere
751	3 ,, ,,	продолговатый мозг	луковица
780	22 de jos	au	du
780	9 ,, ,,	au	du
785	2 de sus	d'air	à air
807	10 ,, ,,	Smidt	Schmidt

1778. — Cercetări de embriologie experimentală, vol. I.

Dat la cules 17.09.1967. Bun de tipar 10.02.1968. Tiraj 1600 ex. Hîrtie velină ilustrații de 80 g/m² și 600 ex. pe hîrtie cretată de 100 g/m² numerotate de la 1 la 600. Format 8/61 × 86 Coli editoriale 45,7 Coli de tipar 101 + 3 planșe pliante tipo. A. 1188/1967.
Indicele de clasificare pentru biblioteci mari: 611 -- 013.9.
Indicele de clasificare pentru biblioteci mici: 611.

Tiparul executat sub comanda nr. 1778 la Întreprinderea poligrafică nr. 3,
Bulevardul 6 Martie nr. 29, București, R.P.R.